

SÉRIE A, N° 3571

N° D'ORDRE :

4443

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

ANDRÉ BEAUMONT

1^{re} THÈSE. — ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DE L'APPARITION DU GLY-
COGÈNE HÉPATIQUE CHEZ LES LARVES D'AMPHI-
BIENS ANOURES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 14 juin 1958 devant la Commission d'examen.

MM. PRENANT	Président.
GALLIEN	} Examinateurs.
JOST	

PARIS

Editions du Bulletin Biologique de la France et de la Belgique
105, Boulevard Raspail

1960

SÉRIE A, N° 3571

N° D'ORDRE :

4443

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

ANDRÉ BEAUMONT

1^{re} THÈSE. — ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DE L'APPARITION DU GLY-
COGÈNE HÉPATIQUE CHEZ LES LARVES D'AMPHI-
BIENS ANOURES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 14 juin 1958 devant la Commission d'examen.

MM. PRENANT *Président.*

GALLIEN } *Examineurs.*

JOST }

PARIS

Editions du Bulletin Biologique de la France et de la Belgique
105, Boulevard Raspail

1960



Digitized by the Internet Archive
in 2026

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE
DE L'APPARITION DU GLYCOGÈNE HÉPATIQUE
CHEZ LES LARVES D'AMPHIBIENS ANOURES

(Avec 7 planches)

SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION ET HISTORIQUE	268
PREMIÈRE PARTIE. — L'APPARITION NORMALE DU GLYCOGÈNE HÉPATIQUE. SES VARIATIONS	
A. — L'apparition du glycogène hépatique	278
B. — Variations quantitatives au cours de la vie larvaire.	292
C. — Conclusions	297
DEUXIÈME PARTIE. — HISTOGENÈSE DE L'HYPOPHYSE, DE LA THYROÏDE, DU PANCRÉAS ET DE L'ORGANE INTERRÉNAL	
A. — Histogenèse de l'hypophyse.	299
B. — Histogenèse de la thyroïde	310
C. — Histogenèse du pancréas.	321
D. — Indications sur l'histogenèse de l'organe interrénal	327
E. — Conclusions	330
TROISIÈME PARTIE. — EXPÉRIENCES D'ABLATION PRÉCOCE DE L'HYPOPHYSE, DE LA THYROÏDE ET DU PANCRÉAS	
A. — Hypophysectomie	332
B. — Thyroïdectomie	336
C. — Pancréatectomie	341
QUATRIÈME PARTIE. — ADMINISTRATIONS HORMONALES	
A. — Thyroxine.	347
B. — Insuline	354
C. — Cortisone	355
D. — A. C. T. H.	361
CINQUIÈME PARTIE. — CULTURE <i>IN VITRO</i> DE FOIE LARVAIRE	
I. — Mise au point d'une technique de culture <i>in vitro</i> de foie larvaire d'Amphibien	364
II. — Résultats	365
III. — Discussion et interprétations	375
CONCLUSION	378

INTRODUCTION ET HISTORIQUE

La fonction glycogénique du foie chez l'embryon de Vertébré a été envisagée pour la première fois par Claude BERNARD (1859) : dans l'espèce humaine, à un stade déterminé du développement — approximativement vers le milieu de la gestation — le foie fœtal accumule progressivement une quantité croissante de glycogène.

Cette autonomie du foie fœtal est cependant mise en doute par PFLÜGER (1903). Chez le Veau et le Mouton, l'apparition du glycogène hépatique serait essentiellement variable et demeurerait subordonnée au régime maternel.

Les observations qui se sont alors succédé chez les Mammifères ont montré que s'il n'existe chez les différentes espèces étudiées aucune concordance en ce qui concerne le moment où le glycogène commence à se déposer en quantité notable dans le foie, dans une espèce donnée, par contre, ce dépôt se produit à un stade sensiblement constant de la gestation : ADAMOFF (1905) (Homme), MENDEL et LEAVENWORTH (1907) (Porc), LOCHHEAD et CRAMER (1908) (Lapin), ZARETZKI (1911) et ARON (1922 *b*) (Cobaye), ARON (1920 *c* et 1922 *b*) (Mouton et Porc), et qu'à partir de ce moment la teneur de l'organe en glycogène, toujours importante, ne semble pas soumise aux fluctuations du régime maternel.

Cherchant le premier à interpréter une telle diversité, ARON rejette *a priori* l'hypothèse de Cl. BERNARD selon laquelle la fonction glycogénique exige pour s'installer une différenciation particulière de la cellule hépatique qui la rendrait apte à synthétiser le glycogène. *Il suppose, au contraire, que l'établissement de la fonction glycogénique est subordonné à l'évolution — variable selon les espèces — de « certains organes embryonnaires ».*

1. — L'histogenèse du pancréas embryonnaire des Mammifères (ARON, 1920 *a*, 1920 *b*, 1922 *a*) montre que 2 générations d'îlots endocrines se succèdent au cours de la vie intra-utérine : les premiers îlots, ou îlots de Laguesse se transforment à un certain stade en îlots de Langerhans identiques à ceux de l'adulte. Ce stade est différent selon les espèces, mais constant pour une même espèce. Or, un parallélisme étroit existe entre l'apparition de ces îlots définitifs et celui du glycogène hépatique (ARON, 1920 *c*). L'action du pancréas endocrine sur la fonction glycogénique de l'adulte étant connue, cette concomitance suggère une double hypothèse : 1^o les îlots de Laguesse ne sont pas fonctionnels ; 2^o la fonction glycogénique s'installe au moment où ils se transforment en îlots de Langerhans sécréteurs d'insuline.

Le même parallélisme sera constaté quelques années plus tard chez les Oiseaux et les Amphibiens. Les premières traces de glycogène sont décelées dans le foie de l'embryon de Poulet au 12^e jour de l'incubation, soit 2 jours après l'individualisation des îlots de Langerhans (POTVIN et ARON, 1927). Chez les larves d'Anoures le foie reste dépourvu de glycogène jusqu'au déclenchement de la métamorphose (ARON, 1928 *a*), en même temps que se différencient les premiers îlots endocrines définitifs (ARON, 1931). De plus, la pancréatectomie réalisée au début de la métamorphose empêche tout dépôt ultérieur de glycogène (ARON, 1928 *a*).

L'installation de la fonction glycogénique du foie embryonnaire des Vertébrés paraît donc chronologiquement concomitante et fonctionnellement sous la dépendance de la sécrétion interne des îlots de Langerhans du pancréas.

2. — Quel est alors le déterminisme de l'apparition des îlots définitifs, sécréteurs d'insuline ? Des considérations purement théoriques amènent ARON à envisager dès 1922 l'hypothèse d'une corrélation fonctionnelle thyroïde-pancréas : l'entrée en activité physiologique de la thyroïde retentirait sur le pancréas endocrine et provoquerait la transformation des îlots de Laguesse en îlots de Langerhans, la sécrétion d'insuline et le dépôt de glycogène dans le foie.

Cette interaction hypothétique est confirmée quelques années plus tard par l'étude de l'évolution morphologique et fonctionnelle de la thyroïde embryonnaire des Mammifères (ARON, 1926). Chez toutes les espèces étudiées, une modification caractéristique de l'aspect structural (épaississement de l'épithélium, fluidification de la colloïde, apparition de vacuoles de résorption) se produit à un stade déterminé de la gestation. Cette flexion morphologique est interprétée comme la traduction

de l'entrée de la thyroïde en activité excrétrice. Ce stade est constant pour chaque espèce, varie d'une espèce à l'autre et coïncide sensiblement avec celui de la maturation des îlots endocrines du pancréas et de l'apparition du glycogène hépatique. Le même parallélisme existe chez les larves d'Amphibiens (ARON, 1928 *a*) et l'embryon de Poulet (ARON, 1931).

Des arguments expérimentaux confirment cette hypothèse. La thyroxine détermine en moins de 24 heures l'apparition prématurée de glycogène dans le foie de jeunes larves de *Rana esculenta* (ARON, 1928 *b*) et de *Rana temporaria* (FONTES et ARON, 1929). Elle déclenche en même temps la transformation des îlots embryonnaires en îlots adultes (ARON, 1931). Mais chez des têtards de *Rana fusca* pancréatectomisés, la thyroxine ne déclenche plus aucun dépôt glycogénique (ARON, 1931) ce qui démontre le relais pancréatique.

3. — Parallèlement aux recherches sur l'évolution embryonnaire du pancréas endocrine et de la thyroïde embryonnaire, ARON étudie celle de la préhypophyse (1929). Chez toutes les espèces de Mammifères étudiées, le lobe antérieur à l'origine est constitué exclusivement de « cellules chromophobes ». A une étape précise de la vie intra-utérine se différencient les premières cellules acidophiles. Plus tard seulement apparaissent les premières cellules « basophiles », rares et inconstantes. La différenciation des cellules acidophiles, variable d'une espèce à l'autre, précède de peu le développement des premiers îlots de Langerhans et l'entrée en activité de la thyroïde. Elle constitue, pour ARON, le signe morphologique d'entrée en activité de l'antéhypophyse. Dès lors, le déclenchement de la fonction glycogénique du foie chez les embryons de Mammifères paraît être le terme final d'une série d'interactions hormonales qui aboutissent à la sécrétion d'insuline par l'intermédiaire du relais thyroïdien.

Le développement morphologique et physiologique de la thyroïde des larves d'Amphibiens étant conditionné par l'hypophyse (SMITH, 1920), il est donc démontré que l'apparition du glycogène hépatique chez le têtard d'Anoure répond à l'institution d'un système de corrélations du même type que celui qui paraît exister chez les Mammifères.

4. — Ces résultats sont synthétisés dans un mémoire d'ensemble « sur le fonctionnement et les corrélations des glandes endocrines embryonnaires chez les Vertébrés » (ARON, 1931). L'auteur y développe sa théorie, selon laquelle « pendant toute une période de la vie embryonnaire qui s'étend jusqu'à la métamorphose chez la Grenouille, jusqu'à la fin de l'incubation chez le Poulet, et jusqu'à une étape plus ou moins avancée de la gestation chez les Mammifères, l'embryon semble poursuivre son développement en l'absence de toute activité excrétrice notable de certaines glandes endocrines ». L'entrée en fonctionnement excréteur de ces glandes (hypophyse, thyroïde, pancréas) est concomitante. Elle répond à l'installation d'un système de corrélations qui déclenche en dernier lieu l'apparition de la fonction glycogénique du foie embryonnaire.

5. — Cette théorie repose en fait essentiellement sur des *considérations morphologiques* et très accessoirement sur quelques *faits expérimentaux*.

a) Son argument principal est la *concomitance* observée entre l'apparition du glycogène hépatique et la *différenciation* histologique de certaines glandes endocrines.

— Or concomitance n'implique pas *hiérarchisation*. ARON a certes constaté que le dépôt de glycogène dans le foie embryonnaire se fait *sensiblement* au moment où se produit une certaine flexion morphologique des îlots pancréatiques, elle-même contemporaine de modifications de la colloïde et de l'épithélium thyroïdiens et de l'apparition des premières cellules acidophiles dans l'anté-hypophyse. Mais il n'a jamais été précisé ⁽¹⁾ que les critères d'entrée en activité de ces trois glandes apparaissent suivant une *chronologie* bien définie dans le sens hypophyse-thyroïde-pancréas. Il est cependant assez peu vraisemblable que tous ces phénomènes soient rigoureusement simultanés. Un certain temps de latence doit nécessairement exister entre le début de la sécrétion anté-hypophysaire qui déclenche le système de

(1) Sauf peut-être en ce qui concerne l'hypophyse.

corrélations et l'apparition du glycogène qui en est la résultante. ARON y fait d'ailleurs appel pour interpréter certains résultats expérimentaux qui ne sont pas en accord avec sa théorie (absence de dépôt glycogénique après injection de thyroxine au fœtus de Mammifère, 1933 b).

— Même en admettant l'éventualité d'un synchronisme rigoureux, les critères histologiques d'entrée en activité des glandes endocrines admis par ARON à cette époque sont actuellement *discutables* et l'on sait même que certains ne sont plus valables.

La différenciation des premières cellules acidophiles dans le lobe antérieur de l'hypophyse ne constitue pas le signe morphologique d'entrée en activité physiologique de cette glande. De plus, ce ne sont pas les cellules acidophiles qui contrôlent par leur sécrétion l'activité thyroïdienne, mais certaine catégorie de cellules *cyanophiles* que ARON voit se différencier *tardivement*, après l'apparition du glycogène hépatique.

La *sécrétion thyroïdienne* est certainement très antérieure au stade où ARON la fait débiter.

Enfin l'existence de deux générations d'*îlots pancréatiques*, les seconds seuls étant fonctionnels, n'est plus admise et les critères d'activité insulino-sécrétrice des îlots de Langerhans, d'acquisition récente, n'ont pu être envisagés par ARON.

b) Si les arguments morphologiques de la théorie hormonale sont critiquables, son *support expérimental* est restreint et n'a été envisagé avec succès que chez les Amphibiens. Les Oiseaux n'ont été l'objet d'aucune investigation, et les essais tentés plus tard chez les Mammifères sont restés infructueux.

6. — Ceci explique qu'à la suite d'ARON, un assez grand nombre de travaux expérimentaux aient été consacrés à la vérification de sa théorie hormonale dans ces deux groupes de Vertébrés.

Dans une première période, l'expérimentation a été surtout *indirecte* et a consisté essentiellement à administrer des hormones à l'embryon puis à étudier leur action sur le glycogène hépatique (c'est surtout l'embryon de Poulet qui a été l'objet de ces recherches).

Ce n'est qu'au cours de ces dix dernières années que des interventions expérimentales *directes* sur le fœtus de Mammifères ont pu être réalisées par JOST et coll. Grâce à la mise au point d'une technique opératoire *in utero* (JOST, 1947). L'ablation de certaines glandes endocrines fœtales (hypophyse, thyroïde, pancréas, surrénales) et leur retentissement sur le glycogène hépatique, la suppléance de ces glandes par l'administration d'hormones appropriées ont permis une étude détaillée de la glycogénèse hépatique fœtale et ont apporté en outre une très importante contribution à l'endocrinologie du fœtus.

Les principaux résultats de ces recherches expérimentales seront rapidement examinés chez les Mammifères, les Oiseaux et les Amphibiens. J'y ajouterai ceux relatifs à l'étude du stade d'apparition du glycogène hépatique et de la charge du foie embryonnaire dans ces trois classes.

A. — L'apparition du glycogène hépatique embryonnaire et ses variations quantitatives.

1. — MAMMIFÈRES

L'apparition du glycogène et la charge hépatique ont été décrites chez le Lapin et le Rat jusqu'à la naissance et suivies pendant les 3 ou 4 premières semaines de la vie post-natale chez le Cobaye et la Souris.

a) *Lapin*. — JOST et JACQUOT (1955) trouvent des teneurs en glycogène faibles (inférieures à 0,2 0/0) du 22^e au 24^e jour de la gestation. A partir du 25^e jour, cette teneur subit un accroissement net (mise en charge) et rapide (teneur au 28^e jour, 2 0/0), comparable à celui observé par LOCHHEAD et CRAMER (1908).

b) *Rat*. — La charge n'est pas brutale comme chez le Lapin mais s'installe progressivement à partir du 17^e jour ⁽¹⁾ (COREY, 1935 a, JACQUOT, 1955), avec cependant une augmentation plus importante au cours du 19^e jour, qui marque pour JACQUOT l'établissement de la fonction glycogénique.

c) *Cobaye*. — Les premières traces de glycogène sont dosables à partir du 55^e jour (HARD, REYNOLDS, WINBURY, 1944) ou du 57^e (NEMETH, INSULL, FLEXNER, 1954). Le taux de glycogène augmente à peu près régulièrement jusqu'à la naissance (68^e jour 11,5 0/0 du poids sec) avec un brusque accroissement non interprété quelques minutes après celle-ci (15 0/0) suivi d'une chute brutale telle que chez le nouveau-né âgé de 10 heures le glycogène n'est plus dosable. Le taux reste nul jusqu'au 15^e jour et atteint au 16^e jour celui de l'adulte (HARD, REYNOLDS, WINBURY, 1944).

d) *Souris*. — L'évolution de la teneur du foie en glycogène est bien différente (ZORZOLI et CROUSE, 1954). Le glycogène apparaît en quantité mesurable le 16^e jour et reste à une valeur moyenne (1,2 0/0) jusqu'à la naissance. Une légère augmentation survient du 4^e jour de la vie post-natale au 14^e jour, suivie d'un brusque accroissement jusqu'à un maximum (4,6 0/0) le 20^e jour. Après une diminution aussi brutale le 22^e jour, la teneur s'abaisse graduellement jusqu'à 2 0/0 le 30^e jour.

2. — OISEAUX

a) *Apparition*. — Techniques histochimiques et dosages mettent en évidence le glycogène dans le foie de l'embryon à partir du 6^e ou du 7^e jour d'incubation : 6^e jour DALTON (1937) ⁽²⁾, SAMES et LEATHEM (1952) ⁽²⁾, RIMNICEANU-MICLEA et LUNGULESCU-DRAGAN (1955) ⁽³⁾, fin du 6^e jour O'CONNOR (1953) ⁽²⁾, entre le 7^e et le 8^e jour GUELIN-SCHEDRINA (1934) ⁽²⁾, LEE (1951) ⁽⁴⁾ et probablement GILL (1938) ⁽⁴⁾ qui trouve des quantités de glycogène « déjà appréciables » au 8^e jour. Ces différences sont certainement dues pour une part aux techniques utilisées, et peut-être aussi à des variations saisonnières qui semblent n'avoir été envisagées que par RIMNICEANU et coll. : ces auteurs constatent que l'apparition du glycogène se fait le 6^e jour chez l'embryon incubé pendant les mois d'été, et seulement du 7^e au 10^e jour au printemps et en hiver.

b) *Charge*. — Contrairement au cas des Mammifères chez lesquels le foie paraît contenir de faibles quantités de glycogène, assez tôt au cours de la vie embryonnaire, puis s'en charge brusquement à un stade précis, le foie des Oiseaux accumule son glycogène dès qu'il est apparu dans les cellules. Cet accroissement serait cependant interrompu dès le 8^e ou le 9^e jour par une brusque diminution qui aboutit le 11^e ou le 12^e jour à une teneur minimum particulièrement basse : DALTON (1937), SAMES et LEATHEM (1952) au moyen des techniques histochimiques ; LEIBSON (1950), KONIGSBERG (1954) ⁽⁵⁾ par dosages.

Ce minimum n'est vu qu'au 13^e jour par RIMNICEANU et coll. qui notent au contraire un maximum net à 10 et 11 jours.

Après cet accident du 11^e, 12^e ou 13^e jour, la teneur du foie en glycogène augmente à nouveau, sauf pour GUELIN-SCHEDRINA qui trouve un maximum particulièrement net à 11 jours (foie complètement chargé) suivi d'une diminution continue à partir du 12^e jour jusqu'à l'éclosion.

Cependant cet accident n'a pas été retrouvé par GILL (1938) et LEE (1951) qui obtiennent une courbe d'accroissement très irrégulière (en « dents de scie ») sans observer de diminution particulièrement vers les 11^e, 12^e ou 13^e jours (GILL indique même un maximum très accusé au 13^e jour et LEE le 12^e). Ces auteurs insistent d'ailleurs

⁽¹⁾ Si le glycogène hépatique n'a pas été dosé avant le 17^e jour, il peut cependant être mis en évidence histochimiquement le 16^e jour au moins (ROSS et GOLDSMITH, 1955).

⁽²⁾ Carmin de Best.

⁽³⁾ Acide periodique, réactif de Schiff.

⁽⁴⁾ Dosage.

⁽⁵⁾ Les résultats de KONIGSBERG ne portent que sur 3 stades (10, 12, 14 jours) et ne sont guère significatifs.

sur les très grandes *variations individuelles* de la teneur du foie de l'embryon de Poulet en glycogène ⁽¹⁾.

Mis à part les résultats de GUELIN-SCHEDRINA, toutes les recherches concordent pour indiquer un accroissement important du glycogène hépatique au cours de la deuxième moitié de l'incubation, jusqu'à un maximum (environ 2,5 0/0) atteint le 14^e jour (et qui se maintient de façon sensiblement constante jusqu'au 19^e jour) (RIMNICEANU et coll.), seulement le 18^e jour (LEE, 1951, WESTON, 1956), le 19^e (GILL, 1938) ou le 20^e (WLADIMIROV, 1930). Survient alors une chute brutale au moment de l'éclosion qui vide à peu près totalement le foie de son glycogène.

3. — AMPHIBIENS

Les dosages effectués au cours de la vie larvaire et de la métamorphose aboutissent à des résultats contradictoires. Tandis que GOLDFEDEROVA (1926) observe une teneur pratiquement constante chez *Rana esculenta*, BILEWICZ (1938) chez *Rana temporaria* note un maximum au moment de la sortie des membres antérieurs suivi d'une chute brusque pendant la résorption de la queue. Il en est de même chez *R. esculenta* (ROSSI, 1956).

B. — Ablation des glandes endocrines susceptibles de jouer un rôle dans la glycogénèse hépatique de l'embryon.

I. — *Hypophysectomie*.

1. — MAMMIFÈRES

L'hypophyse fœtale conditionne plus ou moins étroitement la charge glycogénique du foie.

a) *Souris*. — L'irradiation par les rayons X, de la tête d'embryons de Souris au 13^e jour de la gestation, détruit totalement le lobe nerveux de l'hypophyse, mais laisse persister quelques groupes de cellules appartenant au lobe antérieur (RAYNAUD et FRILLEY, 1947). Ces fœtus, qui poursuivent normalement leur développement, montrent, quelques heures avant la mise bas, du glycogène dans leur foie, mais en quantité *moins considérable* que chez les témoins.

b) *Lapin*. — Chez les fœtus décapités *in utero* à 19, 21, 22 ou 23 jours, avant la mise en charge glycogénique du foie (qui se fait normalement à partir du 25^e jour) cette charge ne survient pas et le foie, 3 à 10 jours après la décapitation, reste pauvre en glycogène comme aux stades antérieurs (JOST et HATEY, 1949 ; JOST et JACQUOT, 1955). Chez les fœtus décapités après le 25^e jour, c'est-à-dire pendant la charge, le foie continue à synthétiser du glycogène à un taux au moins égal à celui atteint le jour de la décapitation (JOST et JACQUOT, 1955). L'implantation, ou l'injection, au fœtus décapité d'hormone gonadotrope, d'insuline (JOST et JACQUOT, 1955) ne rétablit pas le taux normal du glycogène hépatique.

Mais la décapitation est suivie également d'une involution du cortex surrénal (JOST, 1948) et il est possible de suppléer à l'absence de la tête et de rétablir une teneur normale en glycogène hépatique en administrant de l'ACTH au fœtus décapité, ce qui suggère que l'hypophyse et le cortex surrénal fœtal doivent jouer un rôle dans le phénomène (JOST, 1954 ; JOST et JACQUOT, 1954, 1955).

Cependant, l'injection de corticoïdes aux décapités n'a pas permis la charge glycogénique (JOST et HATEY, 1949 ; JOST et JACQUOT, 1955).

⁽¹⁾ Il est probable que des *variations saisonnières* agissent sur la charge du foie comme elles semblent agir sur l'apparition du glycogène (voir à ce sujet DONHOFFER, 1933).

c) *Rat*. — La décapitation du fœtus à 17-18 jours n'empêche pas totalement le foie de se charger en glycogène (JOST et JACQUOT, 1954 ; JACQUOT, 1955) bien qu'elle entraîne une atrophie très nette du cortex surrénal (WELLS, 1948, 1949).

La surrénalectomie de la mère est également suivie d'une charge partielle du foie fœtal (COREY, 1935 b). Mais si la mère est surrénalectomisée à 17 ou 18 jours et le fœtus décapité en même temps, alors le foie ne renferme plus que des traces de glycogène (JOST, 1954 ; JOST et JACQUOT, 1954 ; JACQUOT, 1956). Tout se passe donc, chez le *Rat*, comme si des hormones surrénaliennes maternelles parvenaient à l'embryon et pouvaient suppléer les glandes fœtales déficientes.

Il est enfin possible de prévenir l'atrophie des surrénales des fœtus décapités en leur injectant de l'ACTH (WELLS, 1948, 1949) ou de suppléer à cette atrophie et de rétablir une teneur normale en glycogène hépatique des fœtus, par la cortisone, en l'administrant soit directement au fœtus, soit par l'intermédiaire de la mère (JACQUOT, 1956).

2. — OISEAUX

Les résultats expérimentaux sont peu nombreux et, sous réserve de nouvelles vérifications, paraissent indiquer que l'hypophyse n'est pas indispensable au dépôt de glycogène dans le foie de l'embryon de Poulet.

a) Des quantités importantes de glycogène histochimiquement décelable existent dans le foie d'embryons de 14 à 21 jours dont l'hypophyse a été détruite par irradiation aux rayons X de l'ébauche du prosencéphale entre le 1^{er} et le 3^e jour de l'incubation (WOLFF et STOLL, 1937).

b) De même, la décapitation réalisée à la fin du 3^e jour d'incubation n'empêche pas l'accumulation dans le foie d'embryons de 10, 12 et 14 jours ⁽¹⁾, de quantités de glycogène croissantes, supérieures même à celles qui existent chez les témoins (KONIG-SBERG, 1954).

II. — *Surrénalectomie.*

La surrénalectomie du fœtus de *Rat* au 18^e jour de la gestation détermine une diminution de la teneur du foie en glycogène comparable à celle que produit la décapitation (JACQUOT, 1955, 1956). Si, en outre, la mère a été surrénalectomisée à 14 jours, alors le foie du fœtus n'accumule plus de glycogène (JACQUOT, 1956).

III. — *Pancréatectomie.*

Une pancréatectomie incomplète pratiquée à 17 jours 1/2 ou 18 jours 1/2 chez le fœtus de *Rat* ne semble pas affecter la charge du foie en glycogène (JOST et JACQUOT, 1955).

IV. — *Thyroidectomie.*

L'ablation de la thyroïde du fœtus de *Lapin* ne retentit pas sur la charge du foie en glycogène (JOST et JACQUOT, 1955).

C. — Administrations hormonales à l'embryon.

Des extraits hormonaux bruts ou des hormones purifiées ont été utilisés, soit pour faire apparaître précocement le glycogène hépatique chez des jeunes embryons de Vertébrés, soit — le plus souvent — pour étudier les variations de ce glycogène, ou

(1) Une forte mortalité post-opératoire ne permet pas de suivre les embryons au-delà du 16^e jour.

de la glycémie, chez des embryons plus âgés. L'administration de ces produits se fait soit par injection directe à l'embryon (Mammifères, Amphibiens) soit indirectement en injectant la mère (Mammifères) ⁽¹⁾, les annexes embryonnaires (vitellus, membrane chorioallantoïdienne : Oiseaux) ou en les ajoutant à l'eau d'élevage (Amphibiens).

I. — *Hormones hypophysaires.*

ARON (1933 a, 1933 b) injecte à des fœtus de *Cobaye in utero* à un stade antérieur à 60-85 millimètres, 0,2 à 0,5 mg. d'un *extrait préhypophysaire purifié*, riche en *thyroestimuline* ($1 \text{ cm}^3 = 200$ Unités thyroïde selon ARON). Il obtient une réaction thyroïdienne d'hyperactivité sécrétrice, la transformation anticipée des îlots de Laguesse en îlots de Langerhans, mais n'obtient *pas de dépôt prématuré* de glycogène hépatique.

Par contre, l'injection d'un *extrait préhypophysaire brut* sous la membrane chorio-allantoïdienne d'embryons de Poulet au 8^e jour, ou au 12^e jour de l'incubation (DALTON et HANZAL, 1940) détermine, 6 à 16 heures après, une hyperglycémie et une *augmentation* du glycogène hépatique et musculaire.

L'injection intraspiraculaire de 1/40 de milligramme d'ACTH, ou l'élevage de têtards de *Pleurodèle* dans une solution à 0,5 mg. par litre d'eau ne provoquent aucune apparition de glycogène 24 à 48 heures après le début du traitement (BELLEC, 1958).

II. — *Hormones corticosurrénales.*

Dans les trois classes de Vertébrés étudiées, la cortisone provoque, dans certaines conditions, une apparition précoce du glycogène hépatique ou une augmentation de la teneur du foie en glycogène.

1. — MAMMIFÈRES

Aucune modification du glycogène hépatique maternel et fœtal n'est obtenue par COREY (1935 b) après injection intrapéritonéale de 3 cm^3 d'*extraits corticaux* par jour pendant 5 jours à des *Rates* en fin de gestation.

Mais ROSS et GOLDSMITH (1955) notent au contraire une nette augmentation du glycogène hépatique de *fœtus de Rat* à partir du 16^e jour de la gestation, quand la mère reçoit 75 à 100 milligrammes de cortisone par jour jusqu'à la fin de la gestation. La même augmentation est obtenue chez des *Rats nouveau-nés* qui reçoivent 24 heures après la naissance 0,1 mg. de cortisone par jour.

2. — OISEAUX

Les résultats varient énormément en fonction semble-t-il du stade d'administration et peut-être aussi du lieu d'injection.

DALTON et HANZAL (1937, 1940) injectent $0,1 \text{ cm}^3$ d'*extraits corticaux bruts* (« Eschatin ») sous la *membrane chorio-allantoïdienne* d'embryon de Poulet au 7^e ou au 8^e jour de l'incubation et notent 8 à 16 heures après une *disparition complète* du glycogène hépatique, accompagnée d'hyperglycémie ⁽²⁾. Ce résultat est confirmé par SAMES et LEATHEM (1952) après injection de 1 milligramme d'acétate de cortisone dans le *sac vitellin* au 6^e ou au 8^e jour. Mais si l'injection est faite *après* le 9^e jour, elle détermine au contraire une *augmentation* du glycogène hépatique, maximum chez

⁽¹⁾ Dans ce cas se pose le problème de la perméabilité placentaire.

⁽²⁾ Cette hyperglycémie a été observée également par ZWILLING (1948 b) chez des embryons injectés de la même façon au 5^e jour mais elle ne se manifeste qu'à partir du 8^e et jusqu'au 14^e jour.

des embryons de 14 jours, 24 heures après l'injection. WESTON (1956) injecte la même dose de cortisone sous la membrane chorioallantoïdienne à la fin du 8^e jour et obtient également une *augmentation* à 12, 14 et 16 jours, mais elle n'est vraiment significative et importante qu'au 18^e jour.

3. — AMPHIBIENS

L'action glycogénoformatrice de la cortisone observée à la fois chez les Oiseaux et les Mammifères est retrouvée chez les Amphibiens Urodèles (BELLEC, 1958). Une apparition précoce, mais fugace, est obtenue par élevage des larves dans des solutions à 1, 5 ou 10 milligrammes par litre.

III. — *Insuline.*

1. — MAMMIFÈRES

L'injection d'insuline au *fœtus* de Mammifère normal n'a été faite, semble-t-il que par SCHLOSSMANN et coll.

300 U. injectées à un fœtus de Mouton de 131 jours ne déterminent aucune modification de la glycémie fœtale et maternelle (PASSMORE et SCHLOSSMANN, 1938). Le glycogène hépatique et musculaire de fœtus de Chien en fin de gestation n'est pas influencé par l'injection de 20 ou 60 U. intrapéritonéales (SCHLOSSMANN, 1938).

Mais si l'insuline est administrée à la mère elle détermine d'une part une hypoglycémie maternelle et une hyperglycémie fœtale (BRITTON, 1930, chez le Chat) et d'autre part diminue le glycogène hépatique maternel et fœtal (COREY, 1935 *b*, chez le Rat 6 heures après l'injection intrapéritonéale de 1 U. par 100 grammes de poids du corps en fin de gestation).

2. — OISEAUX

L'embryon de Poulet a été tout particulièrement étudié à ce sujet, surtout du point de vue de la glycémie. Mais les quelques résultats concernant le glycogène hépatique semblent favorables à une action glycogénoformatrice de l'insuline.

A l'exception de VLADIMIROV (1931) tous les auteurs observent une *hypoglycémie* plus ou moins prononcée après injection d'insuline : HANAN (1925) l'obtient chez des embryons de 14-16 jours qui ont reçu 5 à 10 U. dans la chambre à air, DALTON et HANZAL (1937, 1940) 8 à 16 heures après l'injection de 4 U. sous la membrane chorioallantoïdienne au 8^e jour, ZWILLING (1951 *a*) enfin dès le 3^e jour, avec un effet maximum le 4^e jour, chez des embryons injectés avec 2 à 5 U. dans le sac vitellin à la 30^e heure.

Cette hypoglycémie s'accompagne d'une *augmentation* du glycogène hépatique dès le 8^e jour (DALTON et HANZAL, 1937, 1940), seulement entre le 9^e et le 13^e jour (LEIBSON, 1951). ZWILLING (1951 *b*), cependant, ne note aucune différence en ce qui concerne le glycogène total d'embryons injectés à 5 jours (5 U. dans le sac vitellin) bien que les glucides totaux soient très inférieurs à ce qu'ils sont chez les témoins.

L'apparition *précoce* du glycogène hépatique n'a pu être obtenue par GUELIN-SCHEDRINA (1936) 6 à 24 heures après injection de 10 à 20 milligrammes d'insuline (1) dans les vaisseaux d'embryons de 5 et 6 jours. Mais RIMNICEANU et coll. (1955) provoquent un dépôt prématuré dès le 5^e jour en injectant une très faible quantité d'insuline (0,003 U.) dans la membrane chorioallantoïdienne d'embryons au 3^e jour de l'incubation.

(1) ZWILLING (1948 *b*) critique sévèrement l'expérience de GUELIN-SCHEDRINA : les doses d'insuline injectées correspondent en effet à 220 à 440 U.

IV. — *Thyroxine.*

L'obtention d'un *dépôt précoce* de glycogène par la thyroxine n'a pu être confirmée dans l'ensemble des Vertébrés.

1. — MAMMIFÈRES

Chez des fœtus de Cobaye d'âges divers qui ont reçu *in utero* 0,2 à 0,5 mg. de thyroxine, la flexion morphologique des îlots endocrines du pancréas qui suit l'administration d'extrait anté-hypophysaire (riche en thyroestimuline) est notée 36 à 48 heures après l'injection, mais le foie reste vide de glycogène (ARON, 1933 *b*) ⁽¹⁾.

2. — OISEAUX

Des embryons de Poulet reçoivent à partir de la 60^e heure, 1 à 3 injections intravasculaires de thyroxine (1/100 à 1/10.000 de milligramme à chaque injection) (GUELIN-SCHEDRINA, 1934). Le glycogène hépatique apparaît en même temps et suit les mêmes variations que chez les témoins. DALTON et HANZAL (1937) au contraire observent une disparition complète du glycogène hépatique chez des embryons de 8 jours qui ont reçu 1/800 de milligramme de thyroxine sous la membrane chorio-allantoïdienne le 5^e jour. Le même résultat est obtenu chez des embryons de 11 jours injectés à 8 jours avec des doses plus fortes (1/100 à 1/800 de milligramme).

3. — AMPHIBIENS

Chez le Pleurodèle enfin, la thyroxine, à concentrations variées, ne permet pas une apparition précoce du glycogène hépatique (BELLEC, 1958).

En *conclusion*, la démonstration d'un mécanisme endocrinien de l'installation de la fonction glycogénique du foie embryonnaire des Vertébrés n'a été faite que chez le fœtus de Mammifère (JOST et coll.) selon un schéma différent de celui proposé par ARON, et avec des modalités variables d'une espèce à l'autre. Les résultats expérimentaux relatifs aux Oiseaux, bien qu'ils paraissent indiquer la non-intervention — ou tout au moins l'intervention plus discrète de l'hypophyse — demandent à être confirmés et étendus. Ceux que j'ai obtenus chez les Amphibiens et qui font l'objet de ce travail montrent, au contraire, que la cellule hépatique des Anoures peut se charger en glycogène, indépendamment de toute stimulation externe, hormonale ou nerveuse.

PLAN DES RECHERCHES

Ce travail consiste en une étude des facteurs qui déterminent l'apparition du glycogène hépatique chez les larves d'Amphibiens Anoures. A cet effet, chez différentes espèces, un ensemble d'observations et d'expé-

⁽¹⁾ ARON interprète ce résultat en invoquant un temps de latence assez important (supérieur à 48 heures) entre l'injection de thyroxine et la réponse hépatique.

riences complémentaires a été réalisé sur des embryons âgés et des jeunes larves dans le but : a) de chercher à quel stade du développement se fait l'apparition normale du glycogène hépatique ; b) de provoquer expérimentalement une apparition anticipée et c) de tenter de s'opposer à cette apparition dans des conditions expérimentales variées.

Le *premier chapitre* est consacré à l'apparition normale du glycogène hépatique et à ses *variations*, uniquement en fonction de facteurs alimentaires.

L'*histogenèse* des glandes endocrines qui peuvent intervenir *a priori* dans ce dépôt fait l'objet du *second chapitre*.

Un *troisième chapitre* relate des expériences d'*ablation totale* de ces mêmes glandes et leurs répercussions sur l'apparition du glycogène.

Inversement, l'*administration d'hormones* appropriées à des têtards jeunes est faite dans le but de provoquer une apparition prématurée (*chapitre IV*).

L'ensemble des résultats rapportés dans ces quatre chapitres n'étant pas favorable à une intervention hormonale, la recherche d'un dépôt glycogénique en culture « *in vitro* » de foie sur milieu an hormonal fait l'objet du *cinquième et dernier chapitre*.

Les conclusions proposées reposent sur plus de 3.000 observations ou résultats expérimentaux qui ont porté sur les espèces suivantes et plus particulièrement sur celles dont le nom est précédé d'une croix.

DISCOGLOSSIDÆ : + *Discoglossus pictus* (Otth) ; *Bombina variegata* (L.) ; + *Alytes obstetricans* (Laurenti).

PELOBATIDÆ : *Pelodytes punctatus* (Daudin).

BUFONIDÆ : + *Bufo bufo* (L.).

RANIDÆ : *Rana esculenta* (L.) ; + *Rana temporaria* (L.) ; *Mantella aurantiaca* (Mocquard).

Ce travail a été effectué au Laboratoire d'Anatomie et d'Histologie comparées de la Sorbonne sous la direction de M. le Professeur PRENANT à qui il m'est agréable d'exprimer ici toute ma reconnaissance.

M. le Professeur WOLFF a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire du Collège de France, où il m'a initié à la technique de culture organotypique. Qu'il veuille bien accepter, ainsi que M^{mes} STENGER et SENDEL, l'expression de ma respectueuse gratitude.

Je remercie bien vivement M. le Professeur JOST de la sympathie qu'il m'a témoignée et de l'intérêt qu'il a manifesté pour mon travail.

J'adresse également mes remerciements à Mme HELDT, Directeur du Laboratoire de Biologie animale de l'Institut des Hautes Études de Tunis, ainsi qu'aux Étudiants tunisiens du Certificat de Zoologie, qui m'ont toujours fourni, dans d'excellentes conditions, les Discoglosses utilisés dans ce travail.

PREMIÈRE PARTIE

L'APPARITION NORMALE DU GLYCOGÈNE HÉPATIQUE. SES VARIATIONS

Le problème de l'installation de la fonction glycogénique au cours de la vie embryonnaire des Vertébrés doit être abordé suivant deux aspects différents mais complémentaires.

a) Le premier aspect est *qualitatif* et demande à être étudié à l'échelle *cellulaire* par des techniques *histochimiques*. Il consiste à chercher à partir de quel stade les cellules hépatiques jusqu'alors vides de glycogène commencent à s'en charger, c'est-à-dire à déterminer l'*apparition* du glycogène hépatique.

b) Le second aspect est *quantitatif*. On se propose de chercher à quel rythme s'accroît la teneur de l'organe en glycogène au cours de la vie embryonnaire, c'est-à-dire à étudier la *charge* hépatique, au moyen de *dosages* biochimiques.

Ces deux aspects ont été rarement étudiés simultanément ; et, comme je l'ai signalé dans l'Introduction, les renseignements dont nous disposons sur la charge glycogénique du foie des embryons de Vertébrés sont beaucoup plus nombreux et plus précis que ceux relatifs à l'apparition du glycogène.

Je me suis surtout attaché à l'étude de ce dernier problème chez les larves d'Anoures. Je donnerai cependant quelques indications sur l'aspect dynamique de la charge dans un cas particulier.

A. — L'apparition du glycogène hépatique.

La recherche du moment précis de l'apparition d'un produit figuré, chez un embryon, à l'échelle cellulaire, pose avant tout un problème de technique. A moins d'une apparition brutale et massive du produit en question, sa mise en évidence donnera lieu à des résultats d'autant moins *précoces* que la technique utilisée sera moins *sensible*.

L'histoire de la recherche du glycogène hépatique chez les larves d'Amphibiens est à ce sujet fort significative.

1. — Les premières indications sont dues à Cl. BERNARD (1879). Utilisant « la teinture d'iode acidulée » sur tissu frais ⁽¹⁾ il observe que « chez

⁽¹⁾ Cl. BERNARD trempe les embryons frais dans de l'alcool à 38° saturé d'iode et acétifié : les parties riches en glycogène se colorent en rouge vineux ou en brun ;

les larves de Batraciens, les têtards de Grenouille, la matière glycogène est diffuse et n'existe pas encore dans le foie ».

2. — En appliquant la technique à la gomme iodée, à des préparations microscopiques faites à partir de larves de *Rana temporaria*, *Rana esculenta* et *Bufo vulgaris*, fixées à l'alcool absolu, ARON (1928 a) met en évidence du glycogène dans le foie, « à partir du stade marqué par le développement à son début, des bourgeons des membres postérieurs ». Avant le déclenchement des premiers signes extérieurs de la métamorphose le foie ne contient jamais de glycogène histochimiquement décelable.

3. — La même année, HIBBARD (1928) entreprend une étude cytologique et histochimique systématique des premiers stades de l'histogenèse du Discoglosse. Le glycogène distribué au début du développement dans tous les tissus de l'embryon apparaît en très petite quantité dans le foie aux environs du stade XVI ⁽¹⁾. Il augmente graduellement et au stade XIX ⁽²⁾ la coloration du foie par le carmin de Best ou la gomme iodée est très nette. Au stade XX ⁽³⁾ le cytoplasme des cellules hépatiques est plein de glycogène diffus.

1^o TECHNIQUES

a) De toutes les techniques histochimiques de détection du glycogène, celle de Hotchkiss-MacManus est, de loin, la plus sensible. D'exécution rapide et quasi automatique elle donne des préparations claires, facilement comparables, et se conservant parfaitement. Je l'ai utilisée systématiquement au cours de ce travail, après fixation au liquide de Gendre et coupes à la paraffine, toujours faites à l'épaisseur de 5 μ .

Permet-elle de déceler tout le glycogène présent dans un tissu, en d'autres termes le mettra-t-elle en évidence dès son apparition dans le foie embryonnaire ? On sait que les méthodes histochimiques peuvent donner des résultats négatifs là où l'analyse chimique décèle des quantités non négligeables de glycogène (LISON, 1953). La limite de sensibilité a même pu être évaluée pour les réactions à l'iode, au carmin de Best et de Bauer. Elle varie, selon les techniques (et selon la fixation) de 0,02 à 0,7 0/0.

Bien qu'aucune donnée quantitative ne soit connue sur la sensibilité de la réaction à l'acide periodique-réactif de Schiff, LISON (1953) et LILLIE (1954) s'accordent pour la considérer comme beaucoup plus sensible que toutes les autres techniques, son seuil étant particulièrement bas.

Cependant, sa spécificité est nulle, ce qui implique un contrôle enzymatique dans tous les cas douteux ⁽⁴⁾.

b) Les techniques histochimiques — celle de MacManus en particulier — permettent-elles une estimation au moins approximative de la quantité de glycogène réellement présente dans les cellules ?

DEANE, NESBETT et HASTINGS (1946) trouvent une relation sensiblement linéaire entre dosages chimiques et déterminations histophotométriques pour des teneurs en glycogène inférieures à 5 0/0.

Je ne me suis pas livré à une détermination quantitative précise du glycogène

ou bien il humecte directement avec cette solution les « préparations microscopiques » c'est-à-dire les tissus frais dilacérés à sec.

⁽¹⁾ Longueur totale : 14 millimètres ; âge : 11 jours. Premières petites ébauches des pattes postérieures. Probablement stade II-III de TAYLOR et KOLLROSS.

⁽²⁾ Longueur totale : 19 millimètres ; âge : 17 jours.

⁽³⁾ Longueur totale : 23 millimètres ; âge : 24 jours.

⁽⁴⁾ La digestion enzymatique de contrôle a été faite en immergeant les préparations pendant 1 heure dans une solution de « Malt-Diastase » (LIGHT and Co.) à 0,5 0/0 dans l'eau physiologique à 0,85 0/0, à l'étuve à 37°.

hépatique au début de son apparition au moyen de dispositifs histophotométriques. Mais dans les cas où il était utile de *comparer* certains résultats expérimentaux d'apparition précoce, j'ai établi une *échelle* théorique basée sur simple inspection visuelle des préparations colorées à l'A. P. S. ⁽¹⁾. Les degrés et les symboles correspondants sont figurés Planche XIV (fig. 1 à 5).

2° REPÈRES CHRONOLOGIQUES

La fixation de repères dans le développement normal des embryons de Vertébrés est nécessaire aussi bien pour préciser le stade d'une description morphologique, que le moment d'une intervention expérimentale.

Les tables chronologiques du développement de quelques Anoures français ont été établies pour la plupart au cours de ces dix dernières années : *Discoglossus pictus* (GALLIEN et HOUILLON, 1951), *Rana fusca* (KOPSCH, 1952), *Rana dalmatina* (CAMBAR et MARROT, 1954), *Bufo bufo* (CAMBAR et GIPOULOUX, 1956) ⁽²⁾. Les repères adoptés portent essentiellement sur des caractères de morphologie externe, facilement identifiables, qui confèrent à ces tables un grand intérêt pratique.

Des difficultés apparaissent dès qu'il s'agit de *comparer* entre elles des larves d'espèces différentes. La chronologie a été établie chez une espèce donnée, *indépendamment* de celle adoptée antérieurement chez les autres espèces décrites. Il en résulte que certains stades définis par un seul critère chez une certaine espèce, le sont par un autre, unique et différent chez une deuxième espèce, ce qui rend la comparaison difficile, voire impossible. En outre, dans le cas favorable où ces critères portent sur les mêmes caractères chez plusieurs espèces, leur *succession chronologique* est souvent différente. Par exemple, l'éclosion a lieu chez le Discoglosse et le Crapaud avant la formation des bourgeons branchiaux, chez la Grenouille agile alors que les branchies externes sont déjà développées et ramifiées. Inversement, le bec corné apparaît en même temps que les bourrelets operculaires chez la Grenouille agile, bien après chez le Discoglosse, etc.

Enfin le *nombre de stades* définis entre 2 repères précis n'est pas le même chez 2 espèces différentes : par exemple du stade du bourgeon caudal à l'achèvement du spiracle, KOPSCH décrit 6 stades chez *Rana fusca*, GALLIEN et HOUILLON 9 chez le Discoglosse et CAMBAR 10 chez *Bufo bufo*.

Il résulte de toutes ces considérations une fâcheuse confusion que WITSCHI (1953 *b*) a signalée et à laquelle il propose de remédier en fixant une *convention générale*, basée sur la « standardisation » des stades embryonnaires par des systèmes numériques ⁽³⁾. Il est regrettable que cette initiative n'ait pas été suivie, même par les embryologistes qui

⁽¹⁾ Acide periodique-Réactif de Schiff.

⁽²⁾ Les travaux antérieurs à la parution de ces tables définissent les stades larvaires par leur longueur en millimètres.

⁽³⁾ WITSCHI étend même le système qu'il propose à l'ensemble des Vertébrés.

l'avaient sollicitée : CAMBAR (1954), qui l'a cependant pleinement approuvée, adopte pour le tableau de développement du Crapaud, le principe de la standardisation de WITSCHI, mais en utilisant une notation conventionnelle numérique particulière.

Une confrontation des différentes échelles chronologiques du développement des Anoures a été faite par NIEUWKOOP et FABER (1956). Les comparaisons des auteurs hollandais sont discutables. J'indique dans le tableau I les correspondances que j'ai établies, antérieurement à cette publication, pour mon usage personnel, qui me paraissent plus exactes, et à partir desquelles j'ai publié diverses notes préliminaires.

Jusqu'à l'achèvement du repli spiraculaire j'utilise les stades définis dans les monographies indiquées précédemment. Ensuite, de l'apparition du bourgeon de membre postérieur à l'achèvement de la métamorphose j'adopte ceux de TAYLOR et KOLLOSS (1946) établis chez *Rana pipiens*, et qui, par leur nombre et la précision de leur définition, devraient être généralisés à l'ensemble des Anoures.

3^o RÉSULTATS

I. — *Glycogène embryonnaire* (Planche XIV).

La recherche histochimique du glycogène est positive dans le foie de toutes les larves d'Anoures étudiées *dès les plus jeunes stades envisagés* : *Discoglossus pictus*, stade 24, *Rana temporaria*, stade 15, *Bufo bufo*, stade III₇.

Alors que le foie s'est à peine dégagé de l'intestin primitif qui lui a donné naissance, ses cellules sont bourrées de plaquettes vitellines entre lesquelles sont disséminées un grand nombre de petites granulations A. P. S. positives, qui ne se colorent plus après digestion enzymatique (fig. 7).

A ces jeunes stades, le foie n'est d'ailleurs pas le *seul organe* où du glycogène est décelable histochimiquement. On le met en évidence partout où se trouve encore du vitellus : intestin (fig. 8), pancréas, ébauche pulmonaire, tubes du pronephros (fig. 9). Il est également présent en grande quantité dans le muscle cardiaque, les muscles somitiques (fig. 6), l'épiderme, les plexus choroïdes. La substance blanche nerveuse en contient peu.

Ce glycogène « embryonnaire » est connu dans la plupart des tissus des jeunes embryons humains (Cl. BERNARD, 1859) de Poulet et de Truite (JORDAN, 1928). Son existence a été signalée histochimiquement chez l'embryon de *Rana temporaria* par KONOPACKI (1924), de *Rana esculenta* et *Bufo bufo* par OHASHI (1925), de *Discoglossus pictus* par HIBBARD (1928) sans indication quant au foie. Cependant il semble bien qu'il faille interpréter comme glycogène embryonnaire, le glycogène hépatique décrit par ARON et ALFONSI (1924) chez le têtard de *Rana temporaria* de 10 milli-

TABLEAU I

Tables chronologiques comparées du développement des Anoures.

	<i>Discoglossus pictus</i> (GALLIEN et HOUILLOUX, 1951)	<i>Bufo bufo</i> (CAMBAR et GIPOULOUX, 1956)	<i>Rana temporaria</i> (KOPSCH, 1952)	<i>Rana pipiens</i> (TAYLOR et KOLLROSS, 1946)
Bourgeon caudal	16 17 18	II ₁₃ III ₁ III ₂ (Éclo- sion)	10 11	
	19 (Éclo- sion)	III ₃		
Première paire de branchies externes ramifiées	20 21	III ₄ III ₅ III ₆	12 (Écllosion)	
	22 23 24 25 26 27 28		13 14 15 16	
Début de recouvrement des branchies externes	29 30	III ₇ III ₈		
			17	
		III ₉ (Alimen- tation)		
Bourgeons des membres postérieurs	31 32 (Alimen- tation)	III ₁₀		O I
		IV ₁	18 (Alimen- tation)	II
		IV ₂ IV ₃ IV ₄ IV ₅ IV ₆ IV ₇	19 20 21 22	III IV V VI VII
Individualisation d'un premier doigt au membre postérieur		IV ₈ IV ₉		VIII IX X XI
Les cinq doigts du membre postérieur bien apparents		IV ₁₀		
			24	XII XIII XIV XV XVI XVII XVIII XIX XX
Sortie d'un des deux membres antérieurs		IV ₁₁ IV ₁₂ IV ₁₃	25 26	
		IV ₁₄	27	
		IV ₁₅ IV ₁₆	28 29	XXI XXII XXIII XXIV XXV
Disparition totale de la queue		IV ₁₇	30	

mètres de longueur totale (stade 17 de KOPSCH) en même temps que se différencient les premiers îlots de Langerhans. Son existence chez le Pleurodèle a été signalée par BELLEC (1958).

1) Il est aléatoire, étant donnée la technique utilisée, de vouloir préciser la *localisation* de ce glycogène à l'échelle cellulaire. Assez souvent, il a fui devant le fixateur et se rassemble contre la membrane cellulaire : épiderme, pronéphros, muscle, ou contre les plaquettes vitellines : foie, intestin. Cependant il n'est pas rare de le rencontrer en petits grains disséminés dans le cytoplasme (intestin, foie, poumon, pancréas). C'est sous cet aspect qu'il se présente toujours dans la substance blanche nerveuse. Enfin, dans les cellules du pronéphros il apparaît souvent en gouttelettes de diamètre variable, parfois assez gros.

2) L'évolution du glycogène « embryonnaire » au cours des stades ultérieurs montre qu'il n'a pas, dans tous les organes, la même origine.

Il persiste et s'accroît nettement dans le *muscle cardiaque* et les *muscles somitiques*, ce qui suggère qu'il s'agit probablement de glycogène *synthétisé* par les cellules musculaires. KONOPACKI avait constaté cet accroissement chez la Grenouille, et HIBBARD l'avait retrouvé chez le Discoglosse, précisant même qu'il débutait au stade VIII (stade 20 de GALLIEN et HOUILLON).

Dans tous les autres organes, il *régresse* avec leur différenciation et disparaît plus ou moins rapidement selon l'organe et pour un même organe selon l'espèce.

Cette disparition est lente dans le *pronéphros* où elle n'est pas encore achevée au stade III de *Rana temporaria* et *Bufo bufo*, tandis qu'elle est pratiquement terminée à ce stade chez *Discoglossus pictus*. Elle est peu sensible dans le *tissu nerveux* où persiste bien au-delà du stade III, chez toutes les espèces, une coloration diffuse par l'A. P. S. Elle est plus rapide et assez brutale dans l'*épiderme* où le glycogène a toujours été très abondant. A partir du stade I-II de *Rana temporaria* et O de *Bufo bufo* et *Discoglossus pictus*, les cellules épidermiques ne se colorent plus à l'A. P. S. Dans le *foie* et l'*intestin* la disparition du glycogène se fait sensiblement au même stade : 30-31 de *Discoglossus pictus*, 17-O de *Rana temporaria*, III₅-O de *Bufo bufo*.

Dans tous les cas existent des variations individuelles nombreuses, quoique de faible amplitude.

Chez le Pleurodèle le glycogène « embryonnaire » du foie est encore abondant 11 jours après l'éclosion (à 18°); il disparaît progressivement au cours des 12^e à 14^e jours et n'est plus décelable le 15^e jour, un peu avant le percement de la bouche et le début de l'alimentation (BELLEC, 1958).

Signalons enfin que la disparition du vitellus dans le foie et l'intestin en particulier est contemporaine de celle du glycogène, mais qu'il est assez fréquent de trouver encore du vitellus non digéré alors que le glycogène n'est plus décelable histochimiquement.

3) Quelle est la *signification* de ce glycogène ? Deux hypothèses sont possibles *a priori*.

a) Il provient de la *digestion du vitellus*. KONOPACKI admet que le glycogène accumulé dans les ovocytes au cours de l'ovogenèse est peu abondant et qu'il se répartit dans la quasi-totalité des cellules de l'embryon jusqu'au stade neurula. A partir de ce stade, une accumulation importante se produirait, dans quelques organes, aux dépens du vitellus dont les grains manifestent à cette époque un changement d'affinité tinctoriale. HIBBARD (1928) et BRACHET (1944) n'admettent pas cette origine. Le vitellus est surtout protéique, il peut contenir des lipides, mais n'aurait pas de composante glucidique. Il y a lieu de remarquer, en outre, que la disparition du glycogène embryonnaire précède souvent celle du vitellus.

b) Il représente le *glycogène accumulé dans l'œuf* au cours de l'ovogenèse et dont la disparition progressive pendant les premiers stades larvaires a été bien étudiée chimiquement par FAURÉ-FREMIET (FAURÉ-FREMIET et DU VIVIER DE STREEL, 1921 ; FAURÉ-FREMIET et DRAGOIU, 1923). Chez *Rana temporaria*, l'œuf ovarien mûr contient en moyenne 0,1347 mg. de glycogène (environ 7,8 0/0 du poids sec). A l'éclosion l'embryon n'en contient plus que 0,0789 mg. (5,5 0/0 du poids sec) et à la fin de la période de croissance autotrophique (soit environ 12 jours après l'éclosion) il n'y en a plus que des traces. BRACHET et NEEDHAM (1955) confirment dans l'ensemble les résultats de FAURÉ-FREMIET, mais à l'éclosion (les stades postérieurs n'ont pas été étudiés) ils trouvent des quantités de glycogène supérieures. La disparition serait donc moins rapide. Ils pensent, en outre, que le glycogène lié aux protéines (desmoglycogène) disparaît avant le glycogène libre (lyoglycogène).

Il paraît donc légitime d'interpréter ce glycogène présent dans le foie, comme dans la plupart des autres organes embryonnaires, comme le reliquat d'un glycogène ovulaire qui s'est réparti à peu près uniformément dans les cellules de l'embryon au cours de l'organogenèse. Il est peu probable qu'il provienne de la digestion du vitellus qui disparaît souvent après lui. Il est enfin intéressant de constater que sa disparition correspond assez sensiblement avec le début de prise de nourriture par les jeunes larves. Elle marque donc la fin de la période de croissance autotrophique.

II. — *Glycogène définitif.*

Le glycogène embryonnaire disparu, le foie peut rester vide de glycogène pendant un temps plus ou moins long, variable non seulement d'une espèce à l'autre, mais chez une même espèce *en fonction de l'alimentation*.

1° *Quelques exemples seront envisagés :*

1. — Il est possible d'élever des têtards de *Rana temporaria* au laboratoire, dans un milieu « naturel » (eau faiblement renouvelée ; fond de vase ; plantes aquatiques) sans apport alimentaire extérieur. Dans ces

conditions les animaux évoluent très lentement (leur croissance est ralentie) sans que leur foie n'accumule de glycogène. Les premières traces histologiquement décelables n'apparaissent qu'à un stade tardif (stade VI : 2 cas, stade VII : 15 cas, stade VIII : 5 cas) chez des têtards de taille plus petite que la normale qui manifestent déjà les premiers signes de la métamorphose (croissance brusquement accrue des ébauches de membres postérieurs). La métamorphose s'accomplit alors normalement (après une vie larvaire plus longue) et donne naissance à des Grenouilles de petite taille très pauvres en glycogène hépatique.

Il semble donc, dans ce cas particulier, qu'il existe un certain rapport entre l'apparition du glycogène hépatique et la métamorphose. Cette concomitance a été vue par ARON (1928 *a*) et lui a fourni l'un des principaux arguments de sa théorie hormonale.

2. — J'ai montré (BEAUMONT, 1954) que cette coïncidence est purement fortuite et qu'il n'est pas possible de généraliser cette relation à l'ensemble des Anoures.

a) Des têtards de *Discoglossus pictus*, élevés dans les mêmes conditions sont beaucoup moins sensibles à l'absence d'apport alimentaire externe et peuvent commencer à accumuler du glycogène dans les 24 à 48 heures qui suivent la disparition du glycogène embryonnaire (stade I-II : 28 cas). Les têtards de *Bufo bufo* et d'*Alytes obstetricans* offrent un cas intermédiaire : le glycogène définitif est stocké aux environs du stade IV : *Bufo bufo*, stade IV : 24 cas, stade V : 11 cas ; *Alytes obstetricans*, stade III : 5 cas, stade IV : 20 cas, stade V : 2 cas.

b) Par contre, si une nourriture abondante est fournie dès le début de la vie larvaire (salade cuite + foie haché) le dépôt glycogénique se produit plus tôt. Chez le Discoglosse le glycogène embryonnaire n'est pas encore disparu que le glycogène définitif d'origine alimentaire apparaît massivement (15 cas). Dans ces conditions, le foie contient donc du glycogène sans interruption depuis les plus jeunes stades embryonnaires, et l'apparition du glycogène d'origine alimentaire ne se manifeste que par un assez brusque accroissement de sa teneur. Chez *Rana temporaria* et *Bufo bufo*, le dépôt glycogénique se produit plus tôt sans qu'on puisse donner de stade précis : exemple *Rana temporaria*, stade III : 6 cas, stade IV : 8 cas, stade V : 13 cas. *Bufo bufo*, stade III : 12 cas, stade IV : 10 cas. *Alytes* enfin ne se charge en glycogène qu'après le stade III (stade III-IV : 16 cas, stade IV : 11 cas).

c) Dans la nature, enfin, les conditions sont plus favorables à l'apparition d'un dépôt précoce et les têtards de *Rana esculenta* au stade O ont leur foie déjà riche en glycogène, ceux de *Rana temporaria*, *Bufo bufo* et *Alytes* ne commençant à le stocker que vers le stade III-IV.

2^e Conclusions et interprétations.

L'apparition du glycogène définitif dans le foie des larves d'Anoures ne se fait donc pas à un stade fixe du développement, mais dépend essentiellement de *facteurs alimentaires*.

Ces résultats contrastent vivement avec ceux obtenus chez les Mammifères et les Oiseaux. Ils n'ont cependant rien de surprenant si l'on considère les conditions dans lesquelles s'effectue le premier dépôt de glycogène dans ces trois classes. Chez les Mammifères et les Oiseaux, le développement est rigoureusement standardisé, tant du point de vue de sa durée que des conditions dans lesquelles il s'effectue, et de l'apport nutritif à l'embryon. Et c'est au cours de cette période, avant la naissance et la prise de nourriture, que le glycogène hépatique apparaît. Au contraire, le têtard d'Amphibien à l'éclosion ne se nourrit pas, il vit sur ses réserves (vitellus, lipides, glycogène embryonnaire) qui disparaissent à peu près au moment où il est capable de s'alimenter. Et c'est chez un animal complètement autonome du point de vue de ses apports énergétiques, que se fait le dépôt glycogénique. On conçoit facilement que ce dépôt soit sous la dépendance de l'alimentation, et qu'il apparaisse d'autant plus tôt que celle-ci est plus abondante ou plus riche.

Si ces facteurs alimentaires sont primordiaux en ce qui concerne l'apparition du glycogène hépatique chez les larves d'Anoures, leur importance n'est cependant pas négligeable chez les fœtus de Mammifères.

Bien que les résultats de PFLÜGER (1903) aient été contestés, il semble bien que — dans certains cas au moins — l'apparition et la teneur du foie fœtal en glycogène soient subordonnées au régime maternel.

JOST a signalé que chez des Lapines qui ne mangent pas au terme de leur grossesse, le foie des fœtus ne se charge pas en glycogène (JOST et HATEY, 1949 ; JOST et JACQUOT, 1955).

STUART et HIGGINS (1935) avaient montré des fluctuations du glycogène hépatique maternel et fœtal chez le Rat, en fonction de la nourriture. Mais COREY (1935 *a*) ne trouve pas de différence entre les fœtus de mère normalement nourrie et ceux de mère soumise à un jeûne de 12 à 24 heures et JACQUOT (1955) confirme ces résultats après 3 jours de jeûne.

Dans un autre ordre d'idée, des expériences déjà anciennes ont été faites dans le but de modifier la glycémie maternelle et d'étudier ses répercussions sur le glycogène hépatique fœtal. COREY (1935 *b*) détermine une forte hypoglycémie maternelle par l'insuline chez la Rate gestante. La teneur du foie des fœtus en glycogène est à peu près égale à la moitié de celle des témoins. Inversement l'injection de glucose à la mère détermine une hyperglycémie suivie d'une forte augmentation du glycogène hépatique (près du double des témoins).

Chez les Oiseaux, il est possible que les variations constatées à la fois en ce qui concerne l'apparition du glycogène et l'accroissement de sa teneur (et que j'ai indiquées au cours de l'Introduction) puissent être dues à de tels facteurs, par exemple à des variations de composition

chimique du vitellus en fonction des saisons ⁽¹⁾. RIMNICEANU et coll. (1955) insistent sur les différences observées et les interprètent à la lumière de la théorie mitchourienne.

III. — *Apparition prématurée.*

Puisque l'apparition du glycogène hépatique est sous la dépendance de l'alimentation larvaire, on peut penser que l'administration au têtard jeune d'une solution de glucose, par exemple, puisse être suivie d'un dépôt prématuré de glycogène. Dans cette perspective, on montrerait alors que l'apparition normale du glycogène — d'ailleurs essentiellement variable — ne correspond pas à l'acquisition d'une propriété nouvelle par la cellule hépatique — à une sorte de « maturation » selon JOST — mais que cette propriété ne se manifesterait pas en l'absence de métabolites.

De telles injections de glucides ont été faites dans l'œuf de Poule à divers stades du développement et ont abouti à des résultats contradictoires. VLADIMIROV (1931) a injecté 2 cm³ d'une solution de glucose à 5 0/0 dans la chambre à air à 10, 15 et 16 jours : 1 à 3 heures après (durée de l'absorption) il ne note aucune différence dans la glycémie « probablement par stockage hépatique ». Mais DALTON et HANZAL (1940) bien qu'obtenant une hyperglycémie à la suite de 3 injections successives de 100 milligrammes de glucose sous la membrane chorio-allantoïdienne à 10, 11 et 12 jours, ne constatent aucune augmentation du glycogène hépatique, et retrouvent, en particulier, la diminution qui se produit normalement chez les témoins au 12^e jour.

Cependant KATAOKA (1931) en injectant divers glucides (glucose, fructose, mannose, galactose, maltose, lactose) dans des œufs de Poule venant d'être pondus obtient une augmentation du glycogène *total* à 9, 13 et 17 jours.

Dès 1923, FAURÉ-FREMIET et DRAGOIU étudiant l'influence de l'alimentation sur la croissance des têtards de *Rana temporaria* constatent un brusque accroissement avec l'amidon, seul ou associé à d'autres substances (caséine, thymus...). Après 4 jours d'immersion dans un liquide contenant en suspension une certaine quantité d'amidon préalablement dosée, ils trouvent que la quantité d'amidon retenue par les têtards est très notablement supérieure aux besoins énergétiques pendant cette durée, et l'examen histologique révèle une *glycogénèse hépatique intense* attestant la mise en réserve d'une partie de ce glucide ⁽²⁾.

J'ai entrepris une étude systématique de l'action de divers glucides ajoutés à l'eau d'élevage à des stades variés (parfois très jeunes) sur l'apparition précoce du glycogène hépatique. 5 animaux sont fixés, toutes les 24 heures après le début des expériences dans chaque série, et comparés à 5 témoins. Les résultats sont rapportés dans les tableaux II à XI.

⁽¹⁾ Voir à ce sujet ROMANOFF et ROMANOFF (1949).

⁽²⁾ Le stade des têtards n'est pas précisé, mais il s'agit d'animaux qui viennent de terminer leur croissance autotrophique.

TABLEAU II
Bufo bufo. Glucides.

Durée (heures)	Stades	Témoins	Glucose 10 0/00	Saccharose 10 0/00	Amidon 5 0/00
72	III ₉	4 tr 1 —	5 tr	2 tr 3 —	5 + + +
96	I-II	3 — 2 tr	5 + + + +	5 —	4 + + + 1 +
120	II-III	5 —	5 + + + +	5 —	3 + + + 2 —
144	II-III	5 —	5 + + + +	5 —	

TABLEAU III
Discoglossus pictus. Glucides.

Durée (heures)	Stades	Témoins	Glucose 1 0/00	Glucose 5 0/00	Glucose 10 0/00
0	17-19	2 + 3 tr			
72	28	3 + 2 tr	3 + + 2 +	1 + 4 + +	5 + +
120	30-31	2 tr 3 —	3 + + 2 +	1 + + 4 + + +	2 + + 3 — + +
168	I-II	1 — 4 +	5 + +	5 + + +	5 + + +

TABLEAU IV
Discoglossus pictus. Glucides.

Durée (heures)	Stades	Témoins	Glucose 10 0/00	Galactose 10 0/00	Saccharose 10 0/00	Maltose 10 0/00	Amidon 10 0/00
0	29	5 tr					
24	30	5 tr	5 + +	3 + + 2 +	2 tr 3 —	5 +	2 + + 3 + + +
48	30-31	2 + 3 tr	5 + +	5 + + +	5 —	5 + + + +	5 + + + +
72	I	5 —	3 + + + 2 + +	4 + + + 1 + +	5 —	5 + + + +	5 + + + +
96	II-III	5 —	5 + + +	5 + + +	5 —	5 + + + +	5 + + + +

TABLEAU V
Discoglossus pictus. Glucides.

Durée (heures)	Stades	Témoins	Glucose 4 0/00	Galactose 4 0/00	Saccharose 4 0/00	Maltose 4 0/00	Amidon 4 0/00
0	31	3 tr 1 +					
24	32	2 tr 3 —	5 +++	2 + 3 ++	1 tr 4 —	4 + 1 ++	5 +++
48	0-I	2 — 3 +	5 +++	4 +++ 1 ++	5 —	5 +++	3 +++ 2 ++
72	I-II	2 tr 2 ++ 1 +	4 +++ 1 ++	3 +++ 1 ++	5 —	5 +++	

TABLEAU VI
Rana temporaria. Glucides.

Durée (heures)	Stades	Témoins	Glucose 4 0/00	Durée (heures)	Stades	Témoins	Glucose 4 0/00	Saccharose 4 0/00	Amidon 4 0/00
0	13-14	5 +		0	17	5 tr			
24	15-16	5 +	5 +	24	17	5 tr	3 tr 2 —	5 —	5 —
72	17	3 + 2 tr	5 tr	48	17	3 tr 2 —	5 +	5 —	5 —
96	17-18	5 tr	3 + 2 tr	72	17,5	5 —	4 tr 1 —	5 —	5 —

TABLEAU VII
Rana temporaria. Glucides.

Durée (heures)	Stades	Témoins	Glucose 5 0/00	Galactose 5 0/00	Saccharose 5 0/00	Maltose 5 0/00	Amidon 5 0/00
0	15-16	5 tr					
48	17	5 tr	5 tr	2 tr 3 +	5 —	4 — 1 tr	3 — 2 tr
72	17	5 tr	5 tr		5 tr		5 tr
96	17-18	4 tr 1 —	2 + 3 tr		5 tr		5 +

TABLEAU VIII

Rana temporaria. Glucides.

Durée (heures)	Stades	Témoins	Glucose 4 0/00	Galactose 4 0/00	Lactose 4 0/00	Saccharose 4 0/00	Maltose 4 0/00
0	17-18	3 tr 2 —					
24	I-II	7 —	5 —	5 —	5 —	5 —	5 —
48	II	5 —	5 —	5 —	5 —	3 tr 2 —	2 tr 3 ++
72	II	5 —	5 ++	2 — 3 tr	5 —	4 tr 1 —	5 +++++
96	II	5 —	5 +++++	2 tr 3 +	5 —	5 tr	5 +++++

TABLEAU IX

Rana temporaria. Glucides.

Durée (heures)	Stades	Témoins	Glucose 5 0/00	Glucose 10 0/00	Maltose 5 0/00	Amidon 5 0/00
0	III	2 tr 3 —				
24	III	5 —	2 tr 3 +	5 ++	5 ++	5 ++
48	III	5 —	2 + 3 ++	5 +++	5 +++	5 +++
72	III-IV	5 —	5 ++	5 +++	5 +++	5 +++

TABLEAU X

Alytes obstetricans. Glucides.

Durée (heures)	Stades	Témoins	Glucose 4 0/00	Amidon 4 0/00
0	O	5 —		
24	O	5 —	1 tr 4 —	5 —
48	O-I	5 —	1 + 4 ++	2 + 3 ++
72	I	5 —	5 +++	5 +++

TABLEAU XI
Rana esculenta. Glucides.

Durée (heures)	Stades	Témoins	Glucose 4 0/00	Amidon 4 0/00
0	O	5 —		
24	O	5 —	2 tr 3 —	5 —
48	I	5 —	5 ++	5 ++
72	I	5 —	5 ++	5 +++

1. — Un *dépôt précoce* de glycogène hépatique est obtenu en immergeant des têtards de 5 espèces d'Anoures dans des solutions de certains *glucides*.

Dans tous les cas le *saccharose* se montre sans effet. Peut-être n'est-il pas absorbé au niveau de l'épithélium intestinal ? L'*amidon*, le *maltose* et le *glucose* à concentrations variées permettent une glycogénèse intense, qui se traduit même, avec l'amidon et le maltose, par une véritable *surcharge* hépatique.

Le *galactose* ne permet qu'un très faible dépôt chez *Rana temporaria*, alors qu'il détermine un stockage hépatique comparable à celui du maltose chez le Discoglosse.

Le *lactose* donne des résultats négatifs chez *Rana temporaria*.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par BELLEC (1958) chez le Pleurodèle.

2. — Un dépôt massif ne peut être obtenu qu'à partir d'un certain stade larvaire qui correspond assez nettement au début de l'alimentation des têtards (stade 30 du Discoglosse, III₁₀ de *Bufo bufo* et II-III de *Rana temporaria*). Avant cette période, il n'est pas possible de constater une synthèse aussi importante. Mais quelques résultats positifs peuvent cependant être obtenus dès le stade 17 chez *Rana temporaria*, 28 chez le Discoglosse. Ils sont peut-être dus à une absorption limitée au niveau de l'épithélium branchial. Il semble donc que l'apparition anticipée d'un dépôt glycogénique dans le foie soit limitée, dans le temps, par la prise de nourriture.

3. — Cette interprétation est confirmée par quelques expériences d'*injection directe* à la larve jeune d'une solution glucosée, de façon à introduire du glucose dans l'organisme en évitant la barrière intestinale.

En principe, 1/40 de centimètre cube de sérum physiologique glucosé à 1 0/00 est injecté dans la cavité générale de têtards de Discoglosse au stade 27-28. En réalité la quantité de glucose introduite ne peut être connue avec précision, car une partie du liquide introduit ressort par l'orifice d'injection. 24 heures après, un dépôt important de glycogène est observé dans le foie (11 cas).

4. — Il faut enfin remarquer que le dépôt massif de glycogène obtenu par l'amidon, le glucose ou le maltose aux stades relativement âgés, est spécifiquement *hépatique* : les muscles n'en contiennent pratiquement pas plus que les témoins. L'épithélium intestinal en est dépourvu totalement et le pronéphros voit sa quantité de glycogène augmenter quelque peu, mais sans aucun rapport avec ce qui se passe dans le foie. Il ne s'agit donc pas d'une « inondation » dans tout l'organisme, mais d'un *stockage hépatique* banal.

B. — Variations quantitatives au cours de la vie larvaire.

Une fois le glycogène apparu dans les cellules hépatiques, les techniques histochimiques montrent que sa teneur s'*accroît* suivant un rythme qu'il est difficile de préciser sur coupes.

Les données relatives à cet accroissement de la teneur du foie en glycogène sont rares et contradictoires.

BATAILLON (1891) a dosé le glycogène total de têtards d'*Alytes* par le procédé de BRÜCKE et n'en trouve à aucun des stades de la métamorphose, confirmant ainsi l'idée de Cl. BERNARD (1879) selon laquelle le foie des larves d'Amphibiens est dépourvu de glycogène.

A l'aide d'une technique plus rigoureuse (technique de PFLUGER), GOLDFEDEROVA (1926) trouve chez les têtards de *Rana esculenta* des valeurs élevées (9 à 11 0/0) déjà « au stade où les membres postérieurs ne sont ni segmentés ni mobiles » (1). Cette teneur reste sensiblement constante pendant toute la métamorphose et les petites Grenouilles sont encore richement pourvues en glycogène hépatique (6 à 8 0/0).

Cependant ARON (1928 a) avait constaté histochimiquement que le foie des têtards de *Rana temporaria* était particulièrement riche en glycogène juste avant la métamorphose, et que, à la fin de celle-ci, il n'en contenait plus que des traces.

Cette chute au moment de la métamorphose a été confirmée par BILEWICZ (1938) chez la même espèce. La teneur du foie en glycogène qui est de 3,2 0/0 en fin de croissance larvaire, augmente très progressivement jusqu'à la sortie des membres antérieurs, où elle atteint un maximum de 4,25 0/0. Puis survient une chute brutale qui se traduit en fin de métamorphose par un taux de 0,73 0/0 chez les jeunes Grenouilles.

1. — Matériel et techniques.

La petite taille des larves d'Anoures, et de leur foie, impose deux conditions complémentaires à toute recherche quantitative :

- a) L'utilisation de têtards de *grosse taille*.
- b) L'emploi d'une technique de *microdosage*.

(1) Probablement stade V-VI de TAYLOR et KOLLROSS.

a) J'ai choisi l'Alyte comme matériel. Le poids du foie varie depuis moins d'un milligramme à l'éclosion (stade 0) à une centaine de milligrammes au moment de la métamorphose. Les têtards ont été prélevés directement dans la nature ⁽¹⁾ et les dosages effectués immédiatement, sans séjour au laboratoire.

b) La microméthode de HERBAIN (1953) répond à la deuxième condition. Elle nécessite au moins 12 à 15 milligrammes de foie. Après lyse alcaline, précipitation du glycogène par l'alcool, hydrolyse chlorhydrique du glycogène et épuration du liquide d'hydrolyse, le surnageant doit contenir 2,5 à 12,5 γ de glucose par centimètre cube, qu'on dose ensuite par un procédé colorimétrique. Le calcul montre qu'on ne peut ainsi évaluer des taux de glycogène inférieurs à 0,8 0/0. Il est évidemment possible — si le matériel le permet — d'abaisser cette limite inférieure à 0,4 0/0 en partant d'une quantité double de foie (25 à 30 milligrammes).

2. — Résultats (tableau XII et graphique 1).

48 valeurs ont été calculées qui correspondent à 13 stades larvaires d'*Alytes obstetricans*.

— En première approximation, la teneur moyenne du foie en glycogène augmente progressivement jusqu'à l'approche de la métamorphose où elle peut atteindre des valeurs très élevées (plus de 10 0/0 au stade XVII). Puis elle diminue brusquement au moment de la sortie des membres antérieurs (stade XIX), plus faiblement ensuite, de telle sorte que la teneur du foie des jeunes Crapauds est voisine de 3 0/0.

— Cependant les *variations individuelles* sont extrêmement importantes aussi bien chez le têtard jeune (par exemple stades VII et X) qu'en fin de croissance larvaire (stade XIV) et pendant la régression de la queue. Il est probable qu'elle sont dues à des facteurs alimentaires.

Ces variations montrent d'une part que chez des têtards assez près de la métamorphose (stade XIV) la teneur du foie peut être très faible ⁽²⁾; d'autre part que des animaux en pleine métamorphose peuvent présenter une richesse exceptionnelle en glycogène hépatique (7 0/0 au stade XXII : 2 cas).

— Dans une certaine mesure, ces résultats confirment ceux de BILEWICZ (1938) chez *Rana temporaria* : augmentation progressive jusqu'au début de la métamorphose, suivie d'une chute rapide. Mais :

1) Les teneurs mesurées chez *Alytes* sont nettement supérieures à celles de *Rana temporaria*, à tous les stades. La différence provient cer-

⁽¹⁾ Tous les animaux qui ont fait l'objet de ces dosages proviennent manifestement de plusieurs pontes différentes. Ils ont tous été prélevés dans un même bassin des jardins du Muséum, où les conditions alimentaires très favorables assurent une croissance rapide et importante, et les dosages ont été effectués le jour même.

⁽²⁾ Ces animaux se seraient certainement métamorphosés. Mais leur foie se serait-il chargé en glycogène avant cette métamorphose, ou l'auraient-ils effectuée avec une teneur restée faible ?

tainement du fait que BILEWICZ élève ses larves en aquarium et les nourrit de Daphnies et de végétaux, alors que la nourriture des Alytes dans la nature est plus riche et plus variée.

TABLEAU XII

*Évolution de la teneur en glycogène hépatique
au cours de la vie larvaire d'Alytes obstetricans.*

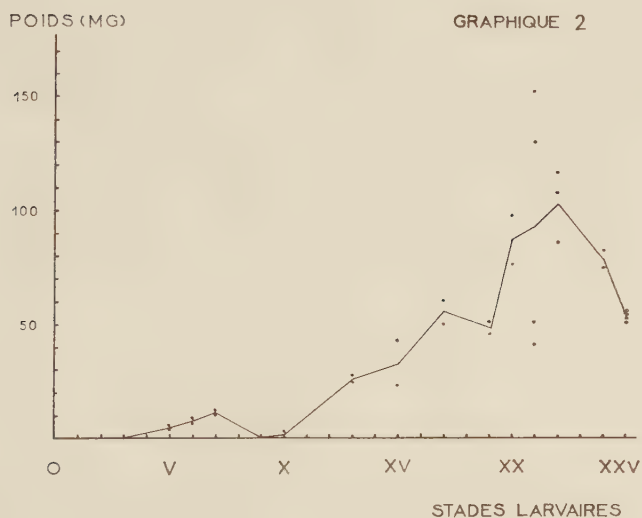
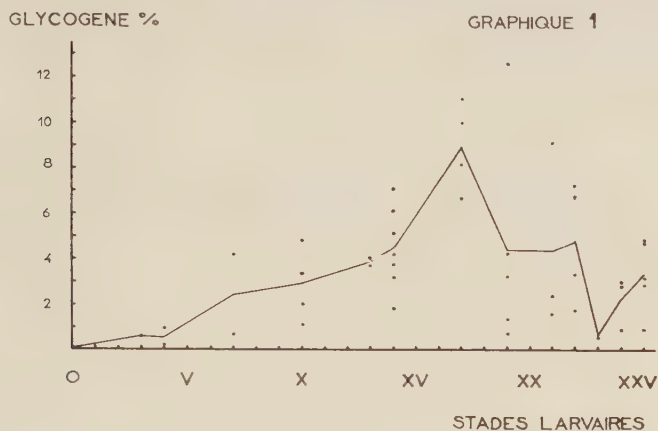
Stades	Glycogène 0/0	Stades	Glycogène 0/0
O	0	XIX	0,70
	0		1,24
	0		3,19
III	4,21		
	0,57		12,57
IV	0,15	XXI	1,51
	0,94		2,29
VII	0,69		9,12
	4,21	XXII	1,68
X	1,14		3,30
	2,02		6,77
	3,40	XXIII	7,20
	4,85		0,50
XIII	3,72		0,66
	4,03	XXIV	0,82
XIV	1,81		2,84
	3,20		2,90
	3,75	XXV	0,89
	4,23		2,85
	5,10		3,12
	6,13		4,73
	7,09		4,81
XVII	6,60		
	8,12		
	9,98		
	11,05		

2) Cette différence systématique des teneurs se traduit, au moment de la chute consécutive à la non-alimentation des têtards en pleine métamorphose, par une disparition quasi totale des réserves glycogéniques chez les jeunes Grenouilles de BILEWICZ alors qu'elle en laisse subsister une quantité *importante* chez l'Alyte.

3) Enfin, le maximum est trouvé chez *Alytes* avant la sortie des membres antérieurs (stade XVII), chez *Rana temporaria* au moment de cette émergence (stade XXI). Il peut s'agir d'une différence spécifique.

La courbe obtenue à partir des valeurs moyennes des dosages pour chaque stade s'apparente à celle de la charge hépatique des Oiseaux par son allure, et diffère de celle des Mammifères par l'absence de palier au départ, suivi d'un point de « virage » à partir duquel la charge s'éta-

blit assez brusquement. Cependant, l'absence de faibles teneurs au stade XVII (où la moyenne des teneurs est maximum) indique une synthèse importante à la fin de la vie larvaire. Elle peut se réaliser brusquement chez les animaux qui ont encore au stade XII une teneur relativement



faible (et dont on peut supposer qu'ils auraient atteint les mêmes teneurs élevées au stade XVII), ou bien très progressivement chez ceux qui avaient déjà un foie riche en glycogène aux stades antérieurs. Il n'est donc pas possible de dire à quel moment se fait la charge glycogénique du foie de l'Alyte : cela dépend, essentiellement, de l'alimentation des têtards.

De toute façon, la teneur maximum observée au stade XVII correspond à des animaux en fin de croissance qui se nourrissent abondamment.

Cette phase larvaire est caractérisée par une synthèse importante de réserves, qui se traduit non seulement par le stockage de glycogène dans le foie, mais aussi par celui de lipides dans l'organe adipeux. La courbe de croissance de cet organe chez *Alytes* est figurée dans le graphique 2 (tableau XIII). Les valeurs obtenues aux différents stades sont beaucoup plus groupées que les valeurs correspondantes du glycogène hépatique, la synthèse lipidique est peut-être moins sensible aux variations d'alimentation ?

TABLEAU XIII

*Évolution du poids du corps adipeux
au cours de la vie larvaire d'Alytes obstetricans.*

Stades	Poids (mg.)	Stades	Poids (mg.)
O	0	XIX	46,4 51,5
III	0,2 0,6	XX	76,1 98,4
V	3,1 4,7	XXI	40,0 49,9
VI	6,2 7,9		130,2 152,7
VII	9,8 11,1		85,1 107,6 116,5
IX	0,5 1,3	XXIV	74,7 82,5
X	2,2 3,4	XXV	50,2 51,4 53,7 54,7
XIII	24,2 26,7		
XV	22,3 41,7		
XVII	49,3 60,1		

La courbe de variation du poids de l'organe adipeux est grossièrement de même type que celle du glycogène hépatique, avec un maximum en pleine métamorphose. Ce maximum s'étale cependant sur plusieurs stades, contrairement à celui du glycogène qui est très bref. L'absence de nourriture pendant les remaniements intestinaux qui accompagnent la régression de la queue, se traduit donc par une brusque chute du glycogène hépatique, une diminution plus tardive des lipides du « corps adipeux ».

En définitive, la charge en glycogène du foie du têtard d'*Alytes obstetricans* commence peu après le début de l'alimentation, est *maximum* en

fin de croissance larvaire, *s'interrompt et chute* brusquement au début de la métamorphose avec l'arrêt de l'alimentation qui marque cette période de profonds remaniements intestinaux et pancréatiques. En outre, la grande *variabilité* de la teneur en glycogène au cours de la charge ne laisse aucun doute sur le rôle *prédominant de l'alimentation sur la synthèse hépatique du glycogène au cours de la vie larvaire*.

C. — Conclusions.

1. — Le foie des jeunes larves d'Amphibiens Anoures (et probablement Urodèles) contient au cours de la période de croissance autotrophique une partie du glycogène de l'œuf, d'origine ovarienne. Ce *glycogène « embryonnaire »* présent également dans la plupart des autres tissus larvaires, *disparaît* progressivement dans le foie peu avant le début de l'alimentation du têtard. Cette disparition correspond à la *fin de la période de croissance autotrophique*.

2. — Après une période plus ou moins longue, pendant laquelle le foie reste vide de glycogène, un *nouveau dépôt* histochimiquement décelable se produit à un stade variable selon l'espèce, et pour une même espèce *en fonction de l'alimentation larvaire*.

3. — Ce *glycogène définitif*, d'origine alimentaire peut apparaître expérimentalement (en immergeant les têtards dans diverses solutions glucidiques) à un stade *très précoce* qui suit de peu la disparition du glycogène embryonnaire ou même *se superpose* à lui avant sa disparition.

4. — Les *variations quantitatives* de la teneur du foie d'*Alytes obstetricans* en glycogène au cours de la vie larvaire présentent un *maximum* peu avant le début de la métamorphose, en fin de croissance des têtards. Les *variations individuelles* très importantes constatées au cours de cette charge confirment le rôle *primordial des facteurs alimentaires dans l'apparition et le stockage du glycogène hépatique des larves d'Anoures*.

L'absence d'un stade précis d'apparition du glycogène hépatique chez les larves d'une espèce donnée d'Anoures et les relations qui existent entre cette apparition et l'alimentation des têtards d'une part, les variations importantes de la teneur en glycogène du foie des larves âgées d'autre part, ne permettent guère, *a priori*, d'invoquer dans le mécanisme de cette apparition et de la charge glycogénique une intervention hormonale plus ou moins complexe, comparable à celle qui a été mise en évidence chez le fœtus de Lapin par JOST et JACQUOT. Dans cette espèce, le foie fœtal se charge en glycogène à partir d'un stade fixe de la vie intra-utérine (25^e jour) et cette charge est contrôlée par l'hypophyse et les surrénales fœtales, probablement à la suite de l'entrée en activité de ces glandes, ou de la sécrétion brusquement accrue d'ACTH et de corticostéroïdes. Cette période correspond également à la différenciation histologique de la thyroïde (les follicules commencent à se remplir de colloïde vers le

stade de 22 jours : JOST, 1953 *a*) qui s'accompagne d'un virage fonctionnel (brusque accroissement de son affinité pour l'iode vers le 22-23^e jour : JOST, MOREL et MAROIS, 1949) et à la différenciation du tractus génital dans le sens masculin (19^e à 24^e jour) sous l'influence des sécrétions hormonales testiculaires (JOST, 1947, 1953 *b*). Dans ces phénomènes également le rôle stimulant de l'hypophyse est démontré entre 22 et 24 jours à la fois par les résultats de son ablation (JOST, 1951, 1953 *b*; JOST, MOREL et MAROIS, 1952) et par les modifications de sa structure histologique (JOST et GONSE, 1955). Cet ensemble de données suggère donc l'existence à cette période de la vie fœtale du Lapin d'une activité hypophysaire particulièrement importante, d'une « crise », d'un « virage physiologique » (JOST, 1955) dont l'importance est évidemment fondamentale du point de vue de la physiologie fœtale.

L'apparition du glycogène hépatique chez les larves d'Anoures est-elle contrôlée par un tel mécanisme endocrinien ? Trois directions de recherches complémentaires sont susceptibles de résoudre ce problème par la confrontation de leurs résultats.

a) Y-a-t-il *concomitance* entre l'apparition du glycogène hépatique et l'*histogenèse* ou des *modifications histologiques* de certaines glandes endocrines pouvant être interprétées comme la traduction morphologique d'une sécrétion, commençante ou brusquement accrue ?

b) L'*ablation* précoce de ces mêmes glandes endocrines est-elle *compatible* avec une apparition normale du glycogène ?

c) Inversement, enfin, l'*administration* de certaines des hormones sécrétées par ces glandes à des têtards normaux peut-elle provoquer une apparition précoce ou accroître le taux du glycogène déjà présent ?

D'après ce que l'on sait du métabolisme hydrocarboné de l'adulte il est légitime, *a priori*, d'envisager l'intervention possible de l'*hypophyse*, de la *thyroïde*, du *pancréas* et de l'*organe interrénal*.

DEUXIÈME PARTIE

HISTOGENÈSE DE L'HYPOPHYSE, DE LA THYROÏDE, DU PANCRÉAS ET DE L'ORGANE INTERRÉNAL

A. — Histogenèse de l'hypophyse.

Le développement normal de l'hypophyse des Anoures a été étudié à de multiples reprises, surtout au point de vue de l'anatomie et de l'anatomie microscopique et principalement au moment de la métamorphose : ATWELL (1918, 1921) chez *Rana pipiens*, ALLEN, TORREBLANCA et BENJAMIN (1929) chez *Bufo americanus*, CLEMENTS (1932) chez *Rana temporaria*, SCHLIEFER (1935) chez *Bufo vulgaris*, KERR (1939) chez ces deux espèces, D'ANGELO (1941) chez *Rana sylvatica*, *R. pipiens* et *R. palustris*.

Mais la différenciation des catégories cellulaires de l'adéno-hypophyse à l'aide de techniques récentes n'est connue que chez *Xenopus laevis* à la suite des travaux de CORDIER (1948, 1949, 1953, 1954) et SAXEN et coll. (1957), et chez *Rana pipiens* (TONEY, 1954). Contrairement aux résultats anciens qui admettent que l'apparition des catégories cellulaires de l'adulte, et partant, l'entrée en activité de l'adéno-hypophyse, n'ont lieu qu'au moment de la métamorphose, l'application de techniques plus sensibles et plus spécifiques met en évidence cette différenciation dès le début de la vie larvaire.

1^o MATÉRIEL ET TECHNIQUES

L'histogenèse hypophysaire a été étudiée chez 4 espèces d'Anoures : *Alytes obstetricans* (55 cas), *Bufo bufo* (28 cas), *Discoglossus pictus* (32 cas) et *Rana temporaria* (35 cas), depuis les stades jeunes à branchies externes (depuis l'éclosion chez *Alytes*) jusqu'à la différenciation des catégories cellulaires et l'acquisition de la structure larvaire définitive, avant la métamorphose. Les modifications hypophysaires qui accompagnent la métamorphose feront l'objet de publications ultérieures.

La fixation a été faite par les liquides de Helly ou de Maximov, le formol sublimé, les liquides de Bouin et de Halmi.

La mise en évidence des catégories cellulaires est effectuée après coloration à l'Azan de Heidenhain, à la fuchsine-paraldéhyde selon GABE (1953) et à l'acide periodique-réactif de Schiff (A. P. S.).

2^o RÉSULTATS1. — *Alytes obstetricans* (planche XV, fig. 10 et 11).

A) Dès l'éclosion, l'hypophyse du têtard d'*Alytes* est déjà différenciée en ses 3 lobes.

a) La *pars nervosa*, réduite, n'est qu'un simple épaissement de l'épithélium infundibulaire, toujours occupé par un volumineux capillaire et richement pourvu en produit de neurosécrétion. Les grains, fortement colorables par la fuchsine paraldéhyde, sont également visibles sur une certaine distance à partir de la *pars nervosa*, le long de l'épithélium diencéphalique, au contact de la *pars anterior*, et même dans la région dorsale de l'adéno-hypophyse, principalement à la limite *pars intermedia*-*pars anterior*.

b) La *pars intermedia*, bien développée, est déjà cyanophile aussi bien par l'Azan, que par l'A. P. S.

c) La *pars anterior* est constituée, en coupe sagittale par une cinquantaine de cellules à cytoplasme peu abondant et à noyau plus riche en chromatine.

L'A. P. S. n'y détermine aucune coloration, mais un certain nombre de très petites granulations sont visibles le long de l'épithélium diencéphalique, dans la partie la plus dorsale de la *pars anterior*. Il est probable qu'elles correspondent aux grains de neuro-sécrétion colorables par la fuchsine-paraldéhyde.

Si aucune cellule cyanophile n'est différenciée à l'éclosion, l'azan colore, par contre, assez faiblement en jaune-orangé toute la partie postérieure de la *pars anterior*, au contact de la *pars intermedia*. Cette région est déjà bien vascularisée, mais les cellules acidophiles ne manifestent encore aucune polarité particulière. La zone « orangeophile » se prolonge latéralement par 2 ailes ventrales qui enserrant la région moyenne et antérieure de la *pars anterior*, sans affinité tinctoriale.

B) Quelques jours après l'éclosion, quand les cellules intestinales ne contiennent plus de vitellus, l'acidophilie à l'azan s'accroît et la *pars anterior* est alors nettement partagée en 2 régions : la postérieure « orangeophile » et l'antérieure « chromophile ».

Dès ce moment, une coloration rose très pâle apparaît dans la région moyenne de la *pars anterior*, après réaction de Hotchkiss-MacManus. Certains noyaux sont entourés d'une sorte de halo diffus, qui ne disparaît pas après digestion enzymatique et qui représente la première manifestation des futures *cellules cyanophiles*.

C) Ce n'est que 2 à 3 semaines après l'éclosion, chez des têtards où commence à s'ébaucher le bourgeon de membre postérieur (stade O-I) que se différencient les premières *cellules cyanophiles*. Elles ne sont

toutefois identifiables que par un très fin liséré périnucléaire, bien colorable en rose vif par l'A. P. S. et qui souligne le contour de certains noyaux. Elles sont localisées à la région moyenne de la pars anterior, autour d'un capillaire central, mais chevauchent en partie sur la région postérieure « orangeophile » et sont également bien visibles dans la région dorsale, contre l'épithélium infundibulaire. A ce niveau, le produit A. P. S. positif est d'ailleurs localisé à l'apex du noyau qu'il recouvre d'une sorte de croûte au contact de l'épithélium. Il est intéressant de remarquer que cette région est, à l'éclosion, caractérisée par la présence de grains de neurosécrétion, probablement émigrés de la pars nervosa.

Les *cellules « orangeophiles »* n'ont pas évolué, mais la pars intermedia accuse le caractère cyanophile de son cytoplasme.

C'est souvent à ce stade que se produit l'*hibernation*. Pendant tout l'hiver le têtard n'évolue pratiquement pas et son hypophyse conserve les caractères qui viennent d'être décrits, si ce n'est l'apparition au sein des cytoplasmes de la pars intermedia de chapelets de gouttelettes acidophiles à l'azan, mais A. P. S. positives.

D) *Stade II.* — Le cytoplasme des *cellules « acidophiles »*, jusqu'alors rare, devient plus abondant. Il est vivement coloré en orangé par l'azan, mais paraît homogène, sans granulations visibles.

Les cellules cyanophiles sont vivement colorables par le bleu de Heidenhain, et le produit MacManus positif se présente désormais en *grains* isolés, disposés à l'apex des cellules contre l'endothélium des capillaires ou l'épithélium diencéphalique.

E) *Stade II-III.* — Le nombre des *cellules cyanophiles* s'accroît considérablement et leur répartition s'étend maintenant à l'ensemble de la pars anterior. Mais leur cytoplasme est toujours réduit, occupé par quelques granulations A. P. S. positives supra-nucléaires nettement polarisées vers les capillaires. Un certain nombre d'entre elles sont toujours au contact de l'épithélium infundibulaire, leur noyau coiffé d'une calotte de grains A. P. S. positifs.

Les *cellules « orangeophiles »* tendent à envahir la partie antérieure de la pars anterior, en ménageant cependant une zone dorsale « chromophobe ». Leur coloration par l'Azan *vire au rouge*, tout au moins pour celles situées contre la pars intermedia.

F) *Stade III.* — Pour la première fois, le cytoplasme des *cellules « acidophiles »* se colore en rouge vif par l'Azan. Il est abondant, et les cellules sont nettement polarisées vers les capillaires. La région moyenne et dorsale de la pars anterior est toujours « chromophobe » et entourée par deux ailes de cellules « acidophiles » qui se prolongent loin en avant dans la partie amincie de la pars anterior contre l'épithélium diencéphalique.

La *pars intermedia*, fortement cyanophile montre quelques gouttelettes « azanophiles », et A. P. S. positives.

2. — *Rana temporaria* (planche XVI, fig. 18 à 21).

A. — *Stade 15*. — L'ébauche adénohypophysaire est *homogène*, sans aucune différenciation en *pars anterior* et *pars intermedia*. Elle a la forme d'une calotte accolée à l'épithélium diencephalique. Sur une coupe sagittale médiane elle est constituée par une vingtaine de cellules à cytoplasme rare, moyennement pigmenté et assez fortement A. P. S. positif. Cette coloration disparaît après digestion enzymatique.

L'Azan met en évidence quelques plaquettes vitellines. Les noyaux sont pauvres en chromatine, avec un nucléole très acidophile.

La *pars nervosa* n'est pas encore individualisée.

B) *Stade 16*. — La coloration rose vif après A. P. S. *disparaît* à peu près totalement.

C) *Stade 17 jeune*. — Au cours de ce stade le pigment *régresse* et un premier capillaire apparaît au centre de la future *pars anterior*. Mais aucune indication de séparation en *pars intermedia* et *pars anterior* n'est visible. La coloration à l'A. P. S. est toujours négative.

D) *Stade 17 âgé*. — A la fin du recouvrement des branchies externes apparaît un léger étranglement transversal qui va séparer la *pars intermedia* de la *pars anterior*, mais la pigmentation est toujours homogène dans l'ensemble de l'ébauche.

Il est assez fréquent d'observer au cours du stade 17, après la technique de MacManus, certaines petites granulations très nettement colorées en rouge par le réactif de Schiff, isolées et inconstantes, souvent situées entre les noyaux de la région moyenne de la *pars anterior*, dans le cytoplasme rare des cellules de cette région. Dans quelques cas, ces grains se colorent encore, plus faiblement, après digestion enzymatique.

E) *Stade 18* (II de TAYLOR et KOLLROSS). — La *pars intermedia* se sépare plus nettement et se dépigmente plus vite que la *pars anterior*. Le cytoplasme est un peu plus abondant que dans les cellules de cette dernière, mais ne se colore pas après l'A. P. S.

A ce stade, l'Azan confère au cytoplasme des cellules de la partie postérieure de la *pars anterior*, contre la *pars intermedia*, une très légère teinte jaune orangé, assez obscurcie par le pigment et qui n'est réellement visible qu'après fixation au liquide de Helly.

La vascularisation devient plus importante et la *pars nervosa* n'est toujours pas différenciée.

F) *Stade III*. — L'individualisation de la *pars intermedia* s'accroît à la fois par sa *séparation* anatomique de la *pars anterior* et par sa *dépigmentation* plus marquée. Une très légère teinte rose est visible après A. P. S.

La *pars nervosa* est maintenant formée à partir de l'épithélium infun-

dibulaire, mais ses dimensions sont très réduites. Un gros capillaire occupe la plus grande partie.

La *pars anterior* est toujours pigmentée, mais un peu moins qu'au stade précédent. Ni l'Azan, ni la technique de MacManus, ne mettent en évidence une affinité tinctoriale quelconque des cellules toujours pauvres en cytoplasme.

G) *Stade IV.* — Les *premières cellules cyanophiles*, très faiblement colorables après A. P. S., apparaissent dans la région moyenne de la *pars anterior*, contre le gros capillaire.

L'Azan ne les met pas en évidence, mais colore nettement en orangé toute la partie postérieure et ventrale de la *pars anterior*, encore pigmentée.

H) *Stade V.* — Les *cellules orangeophiles* à l'Azan sont plus nettes, mais les cyanophiles ne se colorent pas encore par le bleu de Heidenhain.

Par contre, l'A. P. S. montre pour la première fois des cellules cyanophiles très nettes, et polarisées, dont le pôle apical, contre le capillaire central et l'épithélium infundibulaire se colore vivement en rouge.

I) *Stade VIII.* — Les *cellules A. P. S. positives* deviennent colorables par l'Azan. Les *cellules orangeophiles* n'ont pas évolué. Le pigment est encore présent.

J) *Stade X.* — Les *cellules acidophiles*, jusqu'alors orangées après l'Azan, se colorent maintenant en *rouge pur*. Leur cytoplasme est plus abondant et il semble que cette coloration soit due à la présence d'un semis extrêmement dense de micro-granulations azanophiles. En outre, bien que la localisation de ces cellules soit la même que celle des cellules orangeophiles des stades précédents, leur nombre paraît plus *réduit*. Elles sont enfin nettement *polarisées* vers les capillaires de la partie postérieure et ventrale de la *pars anterior*.

3. — *Bufo bufo* (planche XVII, fig. 26 à 29).

A) *Stade III₈.* — L'ébauche adénohypophysaire n'est *pas encore différenciée* en *pars anterior* et *pars intermedia*. Elle est accolée à l'épithélium diencéphalique sous forme d'un croissant à extrémité antérieure large et arrondie et extrémité postérieure amincie. Elle est constituée sur coupe sagittale d'une trentaine de cellules à cytoplasme très rare, mais abondamment et uniformément pigmenté. L'A. P. S. confère une très vague coloration rose pâle aux cytoplasmes, coloration qui disparaît à peu près totalement après digestion enzymatique. Les noyaux, pauvres en chromatine, possèdent un nucléole très acidophile à l'Azan.

La *pars nervosa* n'est pas encore individualisée.

B) *Stade III₉.* — L'ébauche épithéliale s'est nettement agrandie (une cinquantaine de cellules sur coupe sagittale). Le cytoplasme est toujours

aussi rare et pigmenté et pratiquement dépourvu de toute coloration après A. P. S.

C) *Stade III₁₀*. — *Aucune différenciation anatomique* n'est encore visible, et la réaction à l'A. P. S. est toujours *négative*. Le pigment se rassemble en grosses masses périnucléaires.

D) *Stade IV₁*. — Une très légère atténuation de la pigmentation dans la région postérieure de l'ébauche indique l'emplacement de la *pars intermedia*. Mais dans l'ensemble de la glande, les cytoplasmes ne manifestent aucune affinité tinctoriale à l'A. P. S., à la fuchsine paraldéhyde et à l'Azan.

E) *Stade III âgé*. — La *pars intermedia* s'individualise nettement à la fois par la *dépigmentation* annoncée au stade précédent, et par un début de *constriction* de la glande qui l'isole partiellement de la *pars anterior* toujours très pigmentée. L'A. P. S. ne colore pas encore la *pars intermedia*, mais quelques toutes petites taches roses diffuses, ne disparaissant pas après digestion enzymatique, sont visibles, sur quelques coupes, au centre de la *pars anterior*. Leur présence est très irrégulière.

F) *Stade IV*. — La *pars nervosa* s'est constituée par un très léger épaississement de l'épithélium infundibulaire, souvent occupé par un capillaire et l'adénohypophyse est maintenant bien *différenciée anatomiquement en ses deux lobes*.

La *pars intermedia* n'est pas encore totalement débarrassée de son pigment, et l'A. P. S. lui donne une coloration rose très pâle. Elle est séparée de la *pars anterior* par une constriction très marquée qui correspond même à l'existence d'une fine membrane collagène. La présence de pigment encore abondant dans le cytoplasme rare des cellules de la *pars anterior* masque peut-être quelque affinité tinctoriale. Mais l'Azan ne donne aucune coloration visible et l'A. P. S. colore faiblement quelques zones périnucléaires de la région dorsale et moyenne du lobe, contre l'épithélium diencéphalique.

G) *Stade IV âgé*. — La *pars intermedia* devient très nettement A. P. S. positive : les cytoplasmes, plus abondants que dans la *pars anterior*, prennent une couleur rose diffuse, sans granulations, tandis que le pigment régresse encore.

Dans la *pars anterior*, le nombre des *cellules A. P. S. positives* s'est accru. Leur localisation est toujours la même : partie dorsale, contre l'épithélium infundibulaire, et région centrale au niveau d'un gros capillaire. Mais la coloration est toujours diffuse, et le cytoplasme peu abondant.

Pour la première fois, l'Azan donne une teinte jaune-orangé aux cytoplasmes de la partie postérieure de la *pars anterior*, contre la *pars intermedia*.

H) *Stades V et VI.* — Les *cellules cyanophiles* montrent toujours une coloration très pâle après l'A. P. S. et le caractère *acidophile* des cellules oranges après l'Azan s'accroît, mais est toujours masqué par le pigment non encore disparu dans la *pars anterior*.

Aux stades suivants la cytologie hypophysaire évolue peu jusqu'à la métamorphose.

4. — *Discoglossus pictus*.

L'histogenèse de l'hypophyse du *Discoglosse* n'est pas aussi nette et aussi facilement interprétable que celle des trois espèces précédentes.

A) *Stade 28.* — L'ébauche hypophysaire, *non différenciée*, est constituée de cellules toujours pauvres en cytoplasme, mais moins pigmentées et moins colorables par l'A. P. S. que celles de *Rana temporaria* et de *Bufo bufo*.

B) La future *pars intermedia* commence à se différencier au *stade 30* par une pigmentation plus faible.

C) Au cours du *recouvrement des branchies externes* par le repli spiraculaire (*stade 30-31*) l'individualisation de la *pars intermedia* se précise par une constriction qui la sépare partiellement de la *pars anterior*. Cette dernière est toujours plus pigmentée. Le vitellus est disparu. Aucune affinité tinctoriale n'est décelable par l'Azan. Mais la technique de MacManus met en évidence, de façon très irrégulière, dans la *pars anterior*, des *grains* colorables, à contours peu nets, qui ne disparaissent pas complètement après digestion enzymatique. Ces formations seront visibles jusqu'au *stade II*. Elles se détachent assez nettement sur le fond non coloré de la glande. Elles n'ont rien de commun — si ce n'est la coloration — avec les grains de substance A. P. S. positive des cellules cyanophiles qui se différencieront plus tard. Leur signification est énigmatique.

D) *Stade 32.* — La *pars intermedia* est complètement individualisée. Sa pigmentation régresse par rapport à celle de la *pars anterior*. Elle est très faiblement basophile à l'Azan et à l'A. P. S.

La *pars anterior* après coloration à l'Azan montre une certaine affinité pour l'orangé G dans sa région postérieure, contre la *pars intermedia*, où se différencieront les *cellules acidophiles*.

E) *Stades I et II.* — Aucun caractère particulier n'est à signaler si ce n'est la dépigmentation accentuée de la *pars intermedia*, et, au contraire, le rassemblement des grains pigmentaires de la *pars anterior* en petites mottes.

L'A. P. S. colore encore irrégulièrement quelques grains dans la *pars anterior*, mais il ne semble pas que cette coloration soit en rapport avec une quelconque différenciation de *cellules cyanophiles* telle qu'elle se manifeste dans les autres espèces.

Les *cellules acidophiles* de la partie postérieure de la *pars anterior* sont toujours faiblement colorées en orange par l'Azan.

F) *Stade III-III-IV.* — La cyanophilie de la *pars intermedia* s'accuse, aussi bien à l'A. P. S. qu'à l'Azan. Mais aucune évolution ne se manifeste dans la *pars anterior*, si ce n'est la *disparition* des grains colorables par l'A. P. S. et de signification énigmatique.

G) *Stade IV.* — Par contre, apparaissent à ce moment les *premières cellules cyanophiles vraies*, identifiables par leur localisation au *centre de la pars anterior*, au voisinage du capillaire qui la partage en deux. La substance MacManus positive n'est pas encore granuleuse, mais se présente sous forme d'une couronne périnucléaire bien nette.

H) Au *stade V*, ces cellules cyanophiles sont également visibles contre l'épithélium infundibulaire et montrent toujours la même coloration diffuse du cytoplasme.

Les *cellules acidophiles* sont toujours localisées dans la région de la *pars anterior* qui touche à la *pars intermedia* et leur coloration orange par l'Azan ne s'est guère accusée.

I) Ce n'est qu'au *stade VII* que les *cellules cyanophiles* acquièrent leur aspect typique, par la présence de *grains* ou de *croûtes supra-nucléaires* très intensément colorables par l'A. P. S.

3° DISCUSSION ET INTERPRÉTATION (cf. tableau XIV)

1. — *Les cellules acidophiles.*

a) *Apparition.* — Chez les 4 espèces d'Anoures étudiées, elles se différencient très nettement *avant* les cyanophiles. Ce caractère avait déjà été noté par KERR (1939) chez *Rana temporaria* et *Bufo bufo*. Il est confirmé par TONEY (1954) chez *Rana pipiens*. Mais le moment d'apparition de ces cellules est assez variable. KERR (1939) indique un stade où les bourgeons de membres postérieurs sont minuscules, ce que je confirme pour *Rana temporaria* (stade II) mais chez *Bufo bufo* elles apparaissent un peu plus tard (stade IV). Par contre TONEY (1954) chez *Rana pipiens* décrit une certaine variété de cellules acidophiles au moment de l'installation de la circulation dans la nageoire caudale, c'est-à-dire bien avant le recouvrement des branchies externes. A un stade aussi précoce aucune affinité tinctoriale n'est décelable chez les espèces que j'ai étudiées.

Chez *Xenopus laevis*, les recherches de CORDIER (1948, 1949, 1953), KAPPERS (1956), SAXEN et coll. (1957) indiquent, au contraire, une apparition plus tardive des premières cellules acidophiles à un stade où le membre postérieur est déjà bien développé (approximativement stade VIII-IX de TAYLOR et KOLLROSS). Mais dans une publication ultérieure, CORDIER (1954) les décrit plus tôt (stade IV, approximativement).

b) *Localisation.* — Elles occupent, chez les 4 espèces étudiées, la région de la *pars anterior* qui touche à la *pars intermedia*. Cette localisation

avait déjà été indiquée par KERR (1939). Elle n'est pas précisée par TONEY (1954) chez *Rana pipiens*. Chez *Xenopus laevis*, par contre, CORDIER (1948, 1949, 1953, 1954) les décrit dans la partie rostrale de la pars anterior, SAXEN et coll. (1957) dans la région dorsale, contre l'épithélium infundibulaire.

TABLEAU XIV

Matériel	Auteurs	Techniques	Résultats	
			Acidophiles	Cyanophiles (Thyréotropes)
<i>Bufo vulgaris</i>	SCHLIEFER (1935)	Susa. Hématoxyline. Éosine.	Métamorphose.	Métamorphose.
<i>Rana temporaria</i> <i>Bufo bufo</i>	KERR (1939)	Formol neutre. Mallory.	Dégénérescence de l'organe adhésif. Membre postérieur minuscule. Région postérieure.	Flexion et croissance rapide du membre postérieur. Région antérieure.
<i>Rana sylvatica</i> <i>Rana pipiens</i> <i>Rana palustris</i>	D'ANGELO (1941)	Bouin. Formol sublimé, bichromate de K (Liq. de Zahl).	2 variétés déjà différenciées lors de la croissance rapide du membre postérieur.	Peu différenciées lors de la croissance rapide du membre postérieur.
<i>Xenopus laevis</i>	CORDIER (1948)	Bouin. Wolfe-Cleveland.	50 mm. de longueur totale. Partie antérieure.	50 mm. de longueur totale. Partie postérieure.
	CORDIER (1949)	<i>Id.</i>	40-45 mm. de longueur totale. <i>Id.</i>	40-45 mm. de longueur totale. <i>Id.</i>
	CORDIER (1953)	Bouin. Wolfe-Cleveland. Azan de Heidenhain. Hotchkiss selon HERLANT.	55 mm. de longueur totale. <i>Id.</i>	Un peu après, mais avant la métamorphose. <i>Id.</i>
	CORDIER (1954)	<i>Id.</i>	35 mm. de longueur totale. <i>Id.</i>	Un peu plus tard. <i>Id.</i>
<i>Xenopus laevis</i>	SAXEN et coll. (1957)	Helly, A. P. S. Formol neutre-alcool, Azan de Heidenhain.	4 semaines. Région dorsale.	4 semaines. Région ventrale.
<i>Rana pipiens</i>	TONEY (1954)	Formol sublimé. Fuch-sine paraldéhyde combinée à trichrome de GOLDBERG et CHAIKOFF.	Établissement de la circulation dans la queue.	Achèvement de l'opercule (2 catégories).

c) *Variétés*. — Dès leur apparition, les cellules acidophiles se colorent en orangé par la technique de l'Azan, et ne prennent l'azocarmin qu'un peu plus tard. Ce *virage* correspond-il à la maturation d'une même catégorie cellulaire ou à l'apparition d'une 2^e catégorie de cellules acidophiles ? Étant donné l'identité de localisation, il y a lieu de penser qu'il s'agit plutôt d'un changement d'affinité tinctoriale, difficilement interprétable du point de vue de l'histophysiologie, comparable à celui observé chez l'embryon de Poulet (TIXIER-VIDAL, 1954).

Cependant CORDIER (1953) considère que cette différence de coloration est due tout simplement à une différenciation plus ou moins poussée de

l'azocarmin : le cytoplasme des cellules acidophiles du Xénope est rouge si on différencie peu, il devient orangé par le bleu de Heidenhain si l'on différencie beaucoup. Effectivement la différenciation peut influencer sur la colorabilité de ces cellules, mais dans les tout premiers stades les cytoplasmes ne manifestent aucune affinité pour l'azocarmin et se colorent par l'orangé G, pratiquement sans aucune différenciation, alors qu'il faut vraiment dépouiller complètement les cytoplasmes et les noyaux aux stades âgés pour obtenir cette même coloration orangée.

L'existence de 4 catégories de cellules acidophiles chez *Rana pipiens* (TONEY, 1954) est difficilement interprétable.

d) *Fixation et mise en évidence.* — On sait depuis RACADOT (1949) que les fixateurs acides gênent la bonne mise en évidence des cellules acidophiles, parallèlement aux altérations *post mortem*, alors que ces cellules sont vues à des stades plus précoces après fixation par le liquide de Helly. Il en est de même chez les Anoures : les résultats qui ont été rapportés précédemment ont trait à des pièces fixées par les liquides de Helly, de Maximov ou le formol sublimé. Les fixateurs picriqués du type Bouin et Halmi ne permettent pas la mise en évidence des cellules « orangeophiles » aux stades où elles sont décelables par les fixateurs précédents. Ceci explique probablement l'apparition relativement tardive observée par CORDIER et SAXEN chez le Xénope et PASTEELS chez le Pleurodèle.

e) *Signification fonctionnelle.* — L'étude des premiers stades larvaires ne permet aucune interprétation de ces cellules. On peut simplement constater leur existence au tout début de la *croissance* larvaire. Chez le Xénope (CORDIER, 1953, 1954) elles accumulent au cours de la vie larvaire une grande quantité de fines granulations fortement « acidophiles » qui fusionnent en une gouttelette unique, rejetée dans les capillaires au cours de la métamorphose. Cette décharge, en rapport avec la croissance rapide des membres antérieurs, est interprétée comme traduisant la sécrétion d'hormone somatotrope.

Des phénomènes comparables existent chez *Alytes* et feront l'objet d'une publication prochaine.

2. — *Les cellules cyanophiles.*

a) *Apparition.* — Tous les travaux antérieurs à l'utilisation de la technique de Hotchkiss-MacManus, mettent en évidence les cellules cyanophiles à l'aide de colorations beaucoup moins sensibles et ne les signalent qu'au moment de la métamorphose, bien après l'apparition des cellules acidophiles (KERR, 1939 ; D'ANGELO, 1941). En réalité, elles apparaissent bien avant la métamorphose, et quelque temps après les cellules acidophiles, mais sont pauvres en cytoplasme, peu colorables à l'Azan et bien plus difficiles à mettre en évidence que chez l'adulte.

Chez le Xénope, CORDIER (1948-1949) et SAXEN et coll. (1957) les décrivent en même temps que les acidophiles. Cependant CORDIER (1953-1954) indique qu'elles apparaissent un peu après.

Chez *Rana pipiens* enfin, TONEY (1954) voit apparaître les premières cellules cyanophiles dès l'achèvement du spiracle et en distingue déjà, à ce stade, 2 catégories.

Il est intéressant de remarquer que la différenciation des catégories cellulaires de l'adénohypophyse se produit à un stade fixe du développement ⁽¹⁾, *quelles que soient les conditions de nutrition*, et indépendamment de l'apparition — essentiellement variable — du glycogène hépatique. Ce fait est confirmé par PASTEELS (1957) chez le Pleurodèle.

b) *Localisation*. — L'apparition des premières cellules cyanophiles au contact de l'épithélium infundibulaire confirme les observations de PASTEELS (1957) chez le Pleurodèle. L'histogenèse hypophysaire est comparable dans les deux cas : apparition à peu près simultanée du produit de neuro-sécrétion dans la pars nervosa et dans la paroi infundibulaire au contact de la pars intermedia, puis de la pars anterior, et des premières cellules cyanophiles dorsales contre la paroi hypothalamique. Cette concomitance suggère évidemment une relation qui a été exploitée par PASTEELS (1957).

Mais chez les 4 espèces étudiées, les cellules cyanophiles apparaissent en outre au centre de la pars anterior, au contact de capillaires sanguins.

La disposition du produit MacManus positif, en grains formant une calotte supra-nucléaire mince, confirme les observations de SAXEN et coll. (1957) chez le Xénope.

c) *Mise en évidence et fixation*. — Comme dans le cas des cellules acidophiles, la mise en évidence des premières cellules MacManus positives dépend du fixateur utilisé, et les meilleurs résultats sont obtenus après Helly ou formol sublimé.

d) *Signification*. — On sait que la technique de Hotchkiss-MacManus met en évidence les glycoprotéines des cellules à hormones thyroïdiques et gonadotropes de l'adénohypophyse (HERLANT, 1950, PURVES et GRIESBACH, 1951, JOST et GONSE, 1953). On sait d'autre part (GABE, 1957) que la fuchsine-paraldéhyde colore en violet foncé les cellules « thyroïdiques » et en violet plus pâle les cellules à hormone folliculo-stimulante, la distinction entre les deux catégories étant mal aisée.

Chez les 4 espèces d'Anoures étudiées, la fuchsine paraldéhyde est beaucoup moins sensible que la réaction à l'A. P. S. pour déceler les cellules cyanophiles. Mais leur *localisation* au moment de leur apparition, comparée à celle des cellules « thyroïdiques » du Pleurodèle (PASTEELS, 1957) et l'aspect du produit MacManus positif comparé à celui des cellules « thyroïdiques » du Xénope (SAXEN et coll., 1957) permet de les interpréter en tant que telles.

D'ailleurs les cellules « gonadotropes » ne se différencient qu'au moment de la métamorphose, à partir des cellules « chromophobes » de la partie moyenne et dorsale de la pars anterior, tandis que les cellules MacManus positives décelables au tout début de la vie larvaire apparaissent au

(1) Par rapport au stade de développement des bourgeons des membres postérieurs.

moment où la thyroïde entre dans une phase d'histogénèse particulièrement importante (voir chapitre suivant).

Ces cellules sont-elles distinctes des cellules acidophiles mises en évidence par l'azocarmin ? Seule une détection simultanée des 2 catégories cellulaires, ou la décoloration suivie d'une recoloration d'une même préparation à l'aide de deux techniques différentes permettrait de résoudre ce problème soulevé par ORTMANN (1956) chez *Rana pipiens*. Chez cette Grenouille adulte, en effet, il existe deux catégories de cellules « acidophiles », dont l'une est colorable à la fois par l'orangé G et l'A. P. S.

4^o CONCLUSION

L'histogénèse de l'hypophyse a été étudiée chez 4 espèces d'Anoures par les techniques classiques de mise en évidence des diverses catégories cellulaires.

1. — Les *cellules acidophiles apparaissent les premières*. Elles sont déjà visibles à l'éclosion de l'Alyte, dès le stade I chez le Discoglosse et seulement au stade IV chez *Rana temporaria* et *Bufo bufo*.

2. — Ces cellules sont d'abord *orangeophiles*, et ne deviennent *azanophiles* que vers le milieu de la vie larvaire.

3. — Elles sont *localisées* à la région de la pars anterior qui est adjacente à la pars intermedia.

4. — Les *cellules cyanophiles* probablement *thyréotropes* apparaissent *plus tard* : stade I de l'Alyte, stade IV du Discoglosse et stade IV âgé de *Rana temporaria* et *Bufo bufo*, toujours au contact de l'épithélium infundibulaire (riche en produit de neurosécrétion chez l'Alyte) et des capillaires sanguins de la pars anterior.

5. — Cette apparition correspond assez nettement à un *brusque accroissement de taille des follicules thyroïdiens*.

6. — L'histogénèse hypophysaire est chronologiquement définie chez une espèce donnée, et *sans rapport avec l'apparition variable du glycogène hépatique*.

B. — Histogénèse de la thyroïde.

L'histogénèse thyroïdienne des Anoures est bien connue surtout au cours des stades larvaires âgés par de très nombreux travaux qui se sont attachés à l'étude des modifications structurales de la glande accompagnant la métamorphose.

Moins nombreux sont les auteurs qui ont étudié les premiers stades et cherché à mettre en évidence le début de l'activité thyroïdienne. Dans ce domaine, les Anoures européens n'ont pas été étudiés depuis KERR (1939) (*Rana temporaria* et *Bufo bufo*). Seul le Xénope, d'utilisation courante en laboratoire, a fait l'objet de recherches récentes et précises, tant du point de vue de son histogénèse (SAXEN et TOIVONEN, 1955 ; TOIVONEN et

SAXEN, 1956) que du métabolisme de l'iode (SAXEN et TOIVONEN, 1956 ; SAXEN, SAXEN et TOIVONEN, 1956 ; SAXEN, SAXEN, TOIVONEN et SALIMÄKI, 1957). Par contre, divers Anoures américains ont été étudiés : *Hyla regilla* (Gorbmann et Evans, 1941), *Eleutherodactylus nubicola* (Lynn, 1936, 1942), *Hyla brunnea* (Schreckenberg, 1956).

1° MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Le développement de la thyroïde a été étudié chez les mêmes espèces qui ont été utilisées dans le chapitre précédent. Le matériel a été fixé dans les mêmes conditions et ce sont les mêmes animaux qui ont servi à la fois à l'histogenèse hypophysaire et thyroïdienne de façon à comparer chronologiquement la différenciation des 2 glandes.

La colloïde est mise en évidence par l'Azan de Heidenhain, la fuchsine paraldéhyde selon GABE et la réaction de Hotchkiss-MacManus, sur coupes longitudinales de 5 μ d'épaisseur.

2° RÉSULTATS

1. — *Discoglossus pictus* (planche XV, fig. 15 à 17).

A) *Stade 28*. — L'ébauche thyroïdienne *impaire* est située en avant de la bifurcation artérielle ventrale, entre la plaque cartilagineuse hypobranchiale et le muscle génio-hyoïdien sur lequel elle se moule et qu'elle déborde vers l'avant. C'est une masse pleine, constituée sur les sections longitudinales d'une quinzaine de cellules au maximum, à cytoplasme très réduit (les noyaux paraissent se toucher), encore encombré de plaquettes vitellines (bien visibles à l'Azan), parsemé de très nombreux petits grains de *pigment* noir, uniformément répartis dans toute l'ébauche, et totalement imprégné d'une substance colorable en rose pâle par la technique de l'A. P. S.

B) *Stade 29-30*. — Cet aspect persiste sans changement jusqu'au stade 30 compris. On note seulement une légère *migration* postérieure de l'ébauche thyroïdienne qui se situe toujours dorsalement au muscle génio-hyoïdien, mais légèrement en arrière de lui, à mi-chemin de l'aorte ventrale et le partage en *deux lobes* par suite du développement de la copule hyoïdienne à partir du cartilage hypobranchial.

C) *Stade 30-31*. — Au cours du recouvrement des branchies externes par le repli spiraculaire (stade 30-31) les modifications suivantes apparaissent :

a) La *pigmentation* de l'ébauche, toujours *uniforme*, paraît *plus intense*, probablement par suite d'une agglomération limitée des petits grains en *granulations* de plus gros diamètre.

b) La *coloration du cytoplasme* par l'A. P. S. augmente d'intensité. Bien qu'elle soit toujours *diffuse*, elle est nettement plus *accusée* au niveau

de certaines zones, formant un liséré rouge intense, très mince, en croissant, contre quelques noyaux.

c) Puis la partie périphérique du nodule thyroïdien toujours plein s'appauvrit en produit A. P. S. positif tandis qu'au contraire 2 ou 3 plages centrales assez mal délimitées s'individualisent, comme si la substance responsable de la coloration à l'A. P. S. se rassemblait dans ces zones privilégiées qui préfigurent les futures cavités folliculaires. Cependant, ces plages ne correspondent pas encore à ces cavités, elles sont toujours intracytoplasmiques comme l'indique la présence de grains pigmentaires au sein de la tache colorée. Elles résultent simplement d'une disposition particulière de 5 à 6 cellules dont les noyaux, toujours revêtus à leur pôle apical d'une croûte plus intensément colorée, s'écartent en ménageant une zone cytoplasmique relativement importante, A. P. S. positive.

A ce stade l'Azan montre toujours la présence de très nombreuses plaquettes vitellines, et les plages rouges par l'A. P. S. commencent à se colorer très faiblement par le bleu de Heidenhain.

D) *Stade 31.* — A la fin du recouvrement des branchies externes, l'ébauche thyroïdienne continue sa lente migration vers l'arrière et vient recouvrir le tronc artériel.

Les follicules sont virtuellement indiqués autour des plages A. P. S. positives du stade précédent, maintenant mieux délimitées et qui se détachent plus nettement de l'ensemble du tissu thyroïdien à la fois par la disparition à peu près totale de la coloration diffuse périphérique et par la disposition particulière du pigment dont les grains se rassemblent autour des plages A. P. S. positives. Cette migration pigmentaire, à peu près parallèle à celle de la substance A. P. S. positive, aboutit à la formation, par fusion, de petites mottes noires délimitant nettement une plage rouge, qui ne correspond pas encore à une cavité folliculaire.

Le même aspect est visible après coloration à l'Azan, mais la coloration bleue de la substance cyanophile est moins nette qu'après l'A. P. S. Le vitellus est toujours présent, mais en voie de disparition.

E) *Stade 32.* — La migration pigmentaire est pratiquement terminée. Il ne reste plus de grains en dehors des couronnes apicales entourant toujours les plages A. P. S. positives.

F) *Stade I-II.* — Pour la première fois apparaissent de véritables cavités folliculaires, encore peu nombreuses (1 à 2 par lobe), de petit diamètre (très inférieur à celui des noyaux de l'épithélium), mais bien visibles à la suite de la rétraction de la gouttelette de colloïde, ménageant un « vide » entre elle et l'épithélium folliculaire.

G) *Stade II.* — Le nombre des follicules « vrais » augmente (5 à 6 par lobe). La colloïde se colore plus intensément par l'A. P. S. et l'Azan ; le pigment forme toujours un anneau complet de grosses mottes noires mais le diamètre de la cavité folliculaire ne s'accroît que dans les stades II

âgés chez lesquels on commence à voir 1 ou 2 vacuoles de résorption dans certains follicules.

H) *Stade II-III.* — La thyroïde s'allonge et d'ovale devient *fusi-forme*. En même temps les follicules commencent à s'individualiser, conférant un contour bosselé à l'organe.

I) *Stade III jeune.* — L'allongement se poursuit, le nombre des follicules s'accroît (7-8 au maximum en coupe sagittale). Le pigment régresse. La colloïde devient encore plus colorable et certaines cavités folliculaires augmentent de diamètre, bien que celui-ci soit toujours au plus égal à celui des noyaux.

J) *Stade III âgé.* — La disparition du pigment s'accroît : il ne forme plus une couronne complète autour des cavités folliculaires. Les follicules tendent à se séparer les uns des autres.

K) *Stade IV.* — Le pigment n'est pas encore totalement disparu, mais la taille des follicules a subi un *accroissement important*. Toutes les cavités folliculaires ont un diamètre supérieur à celui des noyaux et qui peut atteindre le double pour les follicules les plus évolués. La colloïde montre à sa périphérie un très grand nombre de petites vacuoles de résorption.

A ce stade, la thyroïde acquiert sa *structure larvaire* proprement dite, qu'elle conservera jusqu'à l'approche de la métamorphose. Le pigment disparaîtra totalement au stade VI ou VII.

2. — *Rana temporaria* (planche XVI, fig. 22 à 25).

A) *Stade 14-15.* — L'ébauche thyroïdienne *impaire* est tout à fait comparable par sa position, son aspect et sa structure à celle du Disglosse au stade 28. L'A. P. S. donne également une coloration cytoplasmique diffuse, un peu plus intense au centre du nodule.

B) *Stades 16 et 17 jeune.* — La coloration diffuse à l'A. P. S. disparaît et seule se colore la *zone centrale* visible aux stades précédents.

C) *Au cours du stade 17* l'ébauche s'allonge et le pigment se rassemble au centre, dans l'axe du cordon cellulaire en grains de plus gros diamètre. Cette disposition masque pratiquement la plage A. P. S. positive qui n'est visible que chez des têtards à pigment peu abondant. La coloration diffuse a complètement disparu ; mais les follicules ne sont pas encore différenciés et l'ébauche est toujours *pleine*.

A la fin du stade 17, la thyroïde est *partagée en ses deux lobes* par la copule hyoïdienne qui naît du cartilage hypobranchial.

D) *Stade I.* — Les follicules sont virtuellement indiqués par la migration à peu près complète du pigment en 4 ou 5 plages de grosses mottes,

qui masquent à peu près totalement la substance A. P. S. positive, localisée aux mêmes régions.

E) *Stade II*. — Chaque lobe est allongé en fuseau et dans la région moyenne, la plus large, apparaissent 1 ou 2 petites *cavités* au centre des plages pigmentaires du stade précédent. Chacune de ces cavités, d'un diamètre inférieur à celui des noyaux de l'épithélium est occupée par une toute petite *goutte de colloïde*, intensément colorable par l'A. P. S., entourée de la couronne pigmentaire située à l'apex des cellules de la paroi. La vascularisation est toujours peu abondante.

F) *Stade II âgé*. — Les lobes *s'allongent* et sont constitués chacun par 8 à 9 follicules à peu près régulièrement alignés, presque tous cavitaires et contenant chacun leur petite gouttelette de colloïde. Le pigment n'a pas évolué.

G) *Stade II-III*. — Le diamètre des cavités folliculaires s'accroît et devient *supérieur* à celui des noyaux de la paroi, tandis que la colloïde augmente de volume. Certains follicules s'allongent, deviennent ovalaires et paraissent même s'étrangler en 2 follicules-fils. Les premières *vacuoles de résorption* apparaissent.

H) *Stade III*. — Pas d'évolution appréciable, mais certains têtards montrent encore à ce stade l'aspect présenté au stade II au tout début du creusement des cavités folliculaires.

I) *Stade III-IV*. — L'étirement des lobes thyroïdiens s'accroît, le nombre des follicules augmente (une douzaine au maximum sur coupe longitudinale) mais leur taille n'a pas évolué et ils sont toujours alignés en *une seule rangée*. Par contre, le pigment semble subir une 2^e migration qui lui fait quitter l'apex des cellules folliculaires et gagner les parois latérales de ces cellules, dont les limites sont ainsi nettement soulignées.

J) *Stade IV*. — Ce stade représente une *phase d'histogenèse importante*, caractérisée à la fois par un *nouvel accroissement* du nombre des follicules, disposés maintenant en 2 *rangées* longitudinales superposées, entre le muscle génio-hyoïdien et le cartilage hypobranchial, par une *augmentation* importante de leur taille, par une *diminution* de la *pigmentation*, et par une *vascularisation* plus abondante. De plus, l'épithélium folliculaire acquiert son aspect définitif, par suite de l'abondance du cytoplasme qui lui confère une épaisseur régulière. La colloïde occupe la totalité des cavités, les vacuoles de résorption sont nombreuses et la coloration à l'Azan vire du bleu au rouge dans presque tous les follicules.

K) Ces caractères s'accroissent au *stade V* et un nouvel et important accroissement de taille se produit au stade VI, tandis que la colloïde, dans laquelle les vacuoles de résorption sont très nombreuses, est totalement rouge à l'Azan. La structure ainsi acquise évolue lentement jusqu'aux approches de la métamorphose.

3. — *Bufo bufo* (planche XVII, fig. 30 à 33).

A) *Stade III₈*. — L'ébauche thyroïdienne *impaire, pleine, très pigmentée* et très faiblement imprégnée de substance A. P. S. positive, constitue un massif relativement volumineux mais à contour moins régulier que chez le Discoglosse. Sa situation est la même entre le cartilage hypobranchial et le muscle génio-hyoïdien.

B) *Stade III₉*. — La copule branchiale s'ébauche à ce stade à partir de la plaque cartilagineuse hypobranchiale en arrière de l'ébauche thyroïdienne qui, au cours de sa lente migration, bute et se déforme à son contact. Le pigment, toujours abondant, commence à se rassembler en grains d'assez gros diamètre. Il n'y a pratiquement plus de coloration rouge diffuse par l'A. P. S. Le vitellus est toujours abondant.

A cette période, quelques groupes de cellules thyroïdiennes *essaient* de l'ébauche dont le contour est rendu encore plus irrégulier par ces bourgeonnements.

C) *Stade III₁₀*. — L'ébauche thyroïdienne toujours *impaire*, mais moulée sur la copule et ainsi partagée en 2 lobes réunis par un isthme antérieur, s'allonge. La première disposition folliculaire est visible au niveau de quelques groupes de noyaux entourant une plage A. P. S. positive, floue, et ne correspondant pas encore à une cavité folliculaire. Le pigment est toujours très abondant et à peu près régulièrement réparti.

D) *Stade IV₁* (de CAMBAR) ou *stade II* de TAYLOR et KOLLROSS. — La thyroïde est maintenant paire, par rupture de l'isthme pré-copulaire. A ce stade apparaissent 1 à 2 *follicules vrais*, dans la cavité desquels se colore intensément par l'A. P. S. une *microgoutte de colloïde*. Le diamètre de ces cavités est nettement inférieur à celui des noyaux de la paroi. Le pigment n'est pas encore rassemblé. La vascularisation est toujours peu importante.

E) *Stade III jeune*. — Les quelques rares follicules augmentent de taille et corrélativement la colloïde devient plus abondante (le diamètre des cavités est égal à celui des noyaux). Le pigment s'est rassemblé en grosses mottes formant une croûte continue à l'apex des cellules contre la cavité folliculaire.

F) *Stade III âgé*. — Les follicules s'étirent et s'étranglent, probablement pour se partager en deux. Mais en dehors de cette disposition particulière, leur taille ne s'accroît pratiquement pas. Les premières petites vacuoles de résorption font leur apparition. Le pigment toujours rassemblé au pôle apical des cellules, commence à s'insinuer entre elles.

G) *Stade IV*. — Comme chez *Rana temporaria*, c'est la *phase d'histogénèse importante* au cours de laquelle les follicules subissent un *accroissement de taille* particulièrement net. La *vascularisation* est abondante et les capillaires et le conjonctif qui les accompagne dissocient plus ou moins

les follicules. La colloïde est *très colorable*, riche en vacuoles de résorption et subit son *virage* au rouge à l'Azan. L'épithélium est *très net*, cubique, régulier, et le pigment en régression ne forme plus une couronne continue, limitant la cavité folliculaire.

4. — *Alytes obstetricans* (planche XV, fig. 12 à 14).

A) *Éclosion*. — Dès l'éclosion, la thyroïde du têtard d'*Alytes* est *paire*, constituée d'un petit nombre de follicules *nettement individualisés*, creux, remplis d'une *goutte de colloïde* intensément colorable à l'A. P. S., d'un diamètre au plus égal à celui des noyaux de la paroi. Le cytoplasme est encore peu abondant, mais il n'y a pas trace de pigment. La *vascularisation* est déjà *abondante* et isole complètement les follicules largement *séparés*, mais toujours situés entre le cartilage hypo-branchial, la bifurcation des arcs aortiques et le muscle génio-hyoidien.

D'autres follicules sont en formation, identifiables à une calotte de substance A. P. S. positive qui recouvre certains noyaux. Mais en dehors de ces formations particulières, le cytoplasme est pur et *jamais colorable* par l'A. P. S. Le vitellus est déjà à peu près complètement disparu.

B) *Un à deux jours après l'éclosion*, alors que les cellules de l'épithélium intestinal sont encore bourrées de plaquettes vitellines, le nombre des follicules s'accroît (6 à 7 par section sagittale d'un lobe thyroïdien). Leur taille augmente très légèrement et le diamètre des cavités égale celui des noyaux de l'épithélium. Les premières petites *vacuoles de résorption* apparaissent. La vascularisation est toujours importante et le conjonctif qui accompagne les capillaires accentue la dissociation des follicules.

C) Quand le vitellus est disparu des cellules de l'intestin (3 à 4 jours après l'éclosion) la thyroïde s'étire vers l'avant en direction de la bifurcation aortique et les follicules s'alignent assez régulièrement les plus gros au centre, les plus petits aux extrémités du fuseau. Leur taille augmente encore légèrement et le diamètre de leurs cavités dépasse celui des noyaux épithéliaux de la paroi, mais le cytoplasme est toujours rare.

D) Au cours de la 2^e semaine qui suit l'éclosion, les modifications ne portent que sur l'épithélium folliculaire qui devient *plus net*, le cytoplasme plus abondant permettant un contour régulier. La taille des follicules n'a pas varié, mais la vascularisation est moins importante.

E) *Un mois après l'éclosion*, alors que le bourgeon du membre postérieur est à peine visible (stade O-I) survient une importante *augmentation de taille* des follicules, sans augmentation de leur nombre. Mais l'épithélium est toujours extrêmement plat.

F) A la fin du stade I et au début du stade II survient alors une *phase d'histogenèse particulièrement importante* qui porte à la fois sur la *taille* des follicules, leur *nombre*, l'épaisseur de l'épithélium et la *vacuolisation* de la colloïde et qui aboutit à la *structure larvaire définitive* qui persistera avec ces caractères jusqu'à l'approche de la métamorphose.

3° DISCUSSION (cf. tableau XV)

Si l'on met à part le cas de l'Alyte chez qui l'évolution de la thyroïde n'a été suivie qu'à partir de l'éclosion, stade où la glande est déjà bien différenciée, l'histogenèse thyroïdienne chez les trois autres espèces est très parallèle et conforme dans son ensemble aux descriptions classiques faites chez d'autres Anoures, en particulier à celles récentes et précises de SCHRECKENBERG (1956) : *Hyla brunnea*, et TOIVONEN et SAXEN (1956) : *Xenopus laevis*.

Les caractères communs chez ces différentes espèces sont les suivants :

1. — *Ébauche* solide, impaire, fortement pigmentée de la paroi ventrale du pharynx.

2. — *Migration* postérieure et *localisation* définitive entre le cartilage hypobranchial, le muscle génio-hyoïdien et la bifurcation des troncs artériels.

3. — *Partage* en 2 lobes par suite de la formation du 2^e basi-branchial (à un stade plus ou moins précoce) (cf. JAMES, 1946).

4. — *Vascularisation* peu abondante au moment de l'apparition des premiers follicules avec colloïde intra-vésiculaire.

5. — *Phase d'histogenèse importante* au moment où les bourgeons de membres postérieurs subissent un accroissement particulier de leur taille et où les premières cellules cyanophiles apparaissent dans la pars anterior de l'hypophyse. A ce moment la vascularisation est très développée.

Les différences portent sur la *chronologie* de ces différentes étapes (tableau XV) et sur certains détails qui n'ont pas été signalés jusqu'ici.

1. — Le *partage en 2 lobes* est plus précoce chez *Xenopus laevis* et *Hyla regilla* que chez les espèces françaises où il se fait sensiblement au même stade.

2. — La première *disposition* des cellules thyroïdiennes en « follicules » pleins est au contraire plus tardive chez le Xénope.

3. — Alors que les *premiers follicules vrais avec colloïde extracellulaire* (ou intrafolliculaire) apparaissent sensiblement au même stade chez les espèces françaises, toujours après la formation du spiracle, et au début de la formation du bourgeon de membre postérieur, SCHRECKENBERG (1956) signale déjà cette colloïde avant la fin du recouvrement des branchies externes chez *Hyla brunnea*, tandis que TOIVONEN et SAXEN (1956) ne l'observent qu'au stade III du Xénope. En ce qui concerne *Rana temporaria*, les follicules sont déjà bien visibles, avec colloïde, au stade II alors que KOPSCH (1952) ne les signale qu'au stade IV.

4. — La différenciation un peu plus tardive, constatée chez le Xénope se retrouve à la fois en ce qui concerne l'*apparition des premières vacuoles de résorption* et l'augmentation importante du nombre et de la taille des follicules.

5. — Cette *phase d'histogenèse particulière* qui marque l'acquisition

TABLEAU XV

Matériel	Auteurs	Techniques	Résultats			
			Partage en 2 lobes	Colloïde intracellulaire	Colloïde intrafolliculaire	Histogénèse importante
<i>Rana temporaria</i> <i>Bufo bufo</i>	KERR (1939)	Formol neutre Mallory			Dégénérescence de l'organe adhésif. Membres postérieurs minuscules.	Membre postérieur = courte baguette rectiligne mais avec ébauches de doigts.
<i>Hyla regilla</i>	CORBMANN et EVANS (1941)	Formol	Longueur totale 6 mm.		Longueur totale 12 mm.	Longueur totale 24 mm.
<i>Rana fusca</i>	KOPSCH (1952)	Kopsch Mallory	Stade 17		Stade 20 (IV de T. et K.).	
	SAXEN et TOIVONEN (1955)	Bouin Formol-alcool Azan			Stade 50-51 (III-IV de T. et K.).	
<i>Xenopus laevis</i>	TOIVONEN et SAXEN (1956)		Stade 37-38 (13 de Kopsch)		Stade 49-50-51.	Stade 53 (VI-VII de T. et K.)
	SAXEN et coll. (1957)	Bouin Azan A. P. S.		Stade 47-48 (II de T. et K.)	2 semaines (stade 50).	
<i>Hyla brunnea</i>	SCHRECKENBERG (1956)	Bouin Mallory	Début de résorption des branchies externes		Fin de résorption des bran- chies externes.	Croissance rapide des membres postérieurs.

par la thyroïde de sa structure larvaire définitive se produit à peu près simultanément au stade IV chez les 3 espèces européennes (seulement au stade VII chez le Xénope). Il est intéressant de souligner que cette transformation, cette « maturation », qui fait passer la thyroïde d'une structure tout à fait comparable à celle qui existe de façon permanente chez le têtard hypophysectomisé à la structure larvaire âgée, correspond très nettement à l'apparition dans la pars anterior de l'hypophyse des premières cellules cyanophiles probablement « thyroïdotropes » pour cette raison.

6. — L'apparition de la colloïde, considérée peut-être à tort comme traduisant l'acquisition par la cellule thyroïdienne d'une certaine activité physiologique, mérite d'être discutée avec plus de détails.

Les travaux anciens admettent que la colloïde n'apparaît qu'après l'apparition des follicules (MULLER, 1871 ; HILL, 1935). Pour d'autres, elle apparaît en même temps, mais elle est à ce moment « chromophile » et ne se colore, faiblement d'abord, que quelque temps après le creusement des follicules : KERR, 1939, chez *Rana temporaria*; EGGERT, 1934, chez *Lacerta agilis*; DIMOND, 1952, chez *Chelydra serpentina*; VENZKE, 1949, chez le Poulet et TOGARI et coll. chez le Lapin entre autres et récemment SCHRECKENBERG, 1956, chez *Hyla regilla*. En réalité, l'examen attentif des préparations (quand, chez les Amphibiens Anoures en particulier, le pigment n'est pas trop abondant) ou l'utilisation d'une technique particulièrement sensible comme celle de Hotchkiss-MacManus, montrent que la colloïde apparaît d'abord dans le cytoplasme (le plus souvent en microgouttes) avant d'être excrétée dans la lumière du follicule thyroïdien : SKLOWER, 1925, *Rana temporaria*; UHLENHUTH, 1927, *Ambystoma opacum*; SANDERS, 1935, divers Urodèles; GASCHE, 1939, *Salamandra salamandra*; SAXEN, 1956 et SAXEN et coll. (1957), *Xenopus laevis*.

Cet aspect morphologique de l'histogenèse thyroïdienne paraît correspondre à une certaine activité biochimique de la glande, du moins en ce qui concerne le stockage de l'iode radioactif. On sait que GORBMANN et EVANS (1941) ont montré par une technique autoradiographique que l'iode marqué est stocké par la thyroïde de *Hyla regilla* immédiatement après la formation des premiers follicules. Ce résultat a d'abord été confirmé chez *Xenopus laevis* par SAXEN et TOIVONEN (1955). Mais, utilisant une technique plus sensible, SAXEN (1956) montre la présence d'iode « organique » dans la thyroïde du Xénope avant la formation des follicules, au moment de l'apparition des premières gouttelettes de colloïde cytoplasmique.

Je n'ai pas observé de colloïde sous forme de gouttelettes avant le creusement des follicules chez les 3 espèces étudiées. Mais la coloration diffuse à l'A. P. S. de l'ébauche thyroïdienne, sa concentration au centre du massif cellulaire et sa disposition périphérique, sa répartition en plages mieux délimitées qui préfigurent les futurs follicules, et éventuellement l'aspect en calotte supra-nucléaire, bien visible chez le Discoglosse, semblent indiquer la présence de colloïde avant le creusement des follicules et cor-

respondre peut-être aux gouttelettes intra-cytoplasmiques observées dans les cas cités plus haut.

7. — La présence de *pigment* dans l'ébauche thyroïdienne est connue depuis MULLER (1871) chez *Rana temporaria* qui le signale jusque peu avant la régression complète de la queue, où il disparaît totalement.

Mais la disposition particulière du pigment, avant et au moment de la formation des premiers follicules, ne paraît avoir jamais été signalée. Cette migration, *qui accompagne* celle de la substance A. P. S. positive et aboutit à la formation d'une plage pigmentaire au centre des futurs follicules, qui se creuse et entoure d'un anneau pigmentaire complet la première goutte de colloïde extracellulaire, témoigne peut-être de l'acquisition par la cellule thyroïdienne d'une polarisation fonctionnelle qui se manifeste à ce moment.

8. — L'Alyte enfin offre un *cas particulier*, probablement en rapport avec le développement très spécial des embryons. La thyroïde est déjà différenciée avec follicules et colloïde dès l'éclosion, avant tout développement des bourgeons de membres postérieurs. Et au moment où ces bourgeons apparaissent (stade I-II) survient un brusque accroissement du nombre et de la taille des follicules et de l'épaisseur de l'épithélium. Cette phase d'histogenèse qui ne se produit qu'au stade IV chez les 3 autres espèces d'Anoures, correspond également à la différenciation plus précoce des cellules cyanophiles de la pars anterior de l'hypophyse.

4° CONCLUSION

L'histogenèse thyroïdienne a été étudiée chez 4 espèces d'Anoures. Elle montre, sauf en ce qui concerne *Alytes obstetricans*, un parallélisme assez net qui se traduit par l'apparition de la colloïde intrafolliculaire approximativement au stade II, c'est-à-dire au tout début du développement des bourgeons des membres postérieurs ; et un brusque accroissement de la glande correspondant à une *phase d'histogenèse* particulière au stade IV, au moment où apparaissent les premières cellules cyanophiles de la pars anterior de l'hypophyse. Avant le creusement des follicules, la technique de Hotchkiss-MacManus met en évidence dans le cytoplasme des cellules une substance colorable, d'abord diffuse, qui se concentre ensuite au centre des futurs follicules et qui est peut-être de la colloïde, comparable sous un aspect morphologique différent, aux gouttelettes intracellulaires des auteurs.

Chez l'Alyte, l'histogenèse thyroïdienne est plus précoce, à la fois du point de vue de l'apparition de la colloïde et de l'acquisition de la structure larvaire définitive.

L'histogenèse thyroïdienne est chronologiquement définie chez une espèce donnée, et sans rapports avec l'apparition — variable — du glycogène hépatique.

C. — Histogenèse du pancréas.

I. — *Histologie comparée du pancréas larvaire.*

La structure du pancréas des larves d'Anoures, chez les quelques espèces qui ont été étudiées, est semblable à celle de l'adulte et des Vertébrés supérieurs, c'est-à-dire qu'elle comprend quelques îlots endocrines épars au sein d'un parenchyme exocrine : *Rana temporaria* (ARON et ALFONSI, 1924 ; ARON, 1931 ; FARAGGIANA, 1934 ; JURAND, 1949) ; *Rana nigromaculata* (LIU et LI, 1930) ; *Bufo vulgaris*, *Rana agilis* (FARAGGIANA, 1934) ; *Rana japonica* (HIRATA, 1934) ; *Rana clamitans*, *Rana catesbiana*, *Rana sylvatica*, *Hyla versicolor* (JANES, 1938).

Cependant ARON (1924, 1925) décrit dans le pancréas de *Rana esculenta* « des amas de volumineuses cellules qui s'agencent en importants massifs ou en travées de structure endocrine ». Ces « îlots d'un type spécial » prennent naissance aux dépens des canaux excréteurs pendant la période qui précède la métamorphose. Ils tranchent par leur aspect clair sur le fond plus colorable du parenchyme exocrine. A cette « glande intersticielle » qui n'existe d'ailleurs pas de façon constante mais qui disparaît toujours totalement au moment de la métamorphose (lors de la dégénérescence du pancréas), ARON (1925) propose l'appellation de « glande pancréatique de la métamorphose ».

Cette structure très particulière paraît avoir été observée par FARAGGIANA (1934) chez *Bufo viridis*, *Hyla arborea* et *Bombinator pachypus*. Dans le pancréas de ces 3 espèces, l'auteur décrit des « cordons intersticiels » dans le tissu exocrine, composés de larges cellules polyédriques « qui sont disposées de telle façon qu'elles limitent une lumière de diamètre variable ». Les îlots « secondaires » se forment à partir de ces cordons.

1^o MATÉRIEL ET TECHNIQUES

L'anatomie microscopique du pancréas larvaire a été étudiée et comparée chez les espèces suivantes : *Alytes obstetricans*, *Pelodytes punctatus*, *Discoglossus pictus*, *Rana esculenta*, *Rana temporaria* et *Bufo bufo*.

Deux types de fixation sont employés pour l'étude topographique : le mélange de Carnoy II pour la conservation des ribonucléines et leur coloration par la méthode de Pappenheim-Unna, le liquide de Bouin suivi d'une coloration par la méthode de Mann-Dominici, le trichrome de Prenant (variante Gabe) ou l'Azan de Heidenhain.

L'interprétation de la structure particulière du pancréas de l'Alyte (BEAUMONT, 1953 a) a nécessité la recherche du *chondriome* sur pièces fixées au liquide de Regaud, postchromées et colorées par la fuch sine d'Altmann selon GABE (1947), des *activités phosphomonoestérasiq*ues après fixation à l'acétone selon Gomori.

Les îlots endocrines sont étudiés par les techniques au violet de gentiane neutre de Bensley, l'imprégnation argentique selon Gros-Schultze, l'Azan de Gomori et l'Azan de Schleicher selon GABE (1958) pour les cellules A, l'hématoxyline chromique phloxine selon Gomori et la fuchsine paraldéhyde selon GABE (1953) pour les cellules B.

2° RÉSULTATS

Dans une publication antérieure (BEAUMONT, 1953 a) j'ai décrit la structure très particulière du pancréas d'*Alytes obstetricans*. Cette structure a été, par la suite retrouvée chez *Pelodytes punctatus* et, beaucoup moins différenciée, chez *Discoglossus pictus*.

1. — Le pancréas d'*Alytes obstetricans* (fig. 38, planche XVIII). — Sous une couche périphérique d'acini exocrines plus ou moins épaisse une coloration topographique banale (triple coloration de Prenant, ou Azan classique) montre une volumineuse formation centrale constituée de cordons ou de tubes étroitement accolés, s'insinuant même entre les acini, au sein de laquelle se rencontrent les îlots endocrines. Elle existe de façon constante pendant toute la période larvaire et disparaît au moment de la métamorphose, en même temps que dégénèrent, puis se reconstituent les acini exocrines. Le pancréas de l'adulte est tout à fait comparable à celui des autres Anoures.

Dans sa partie centrale, cette formation se compose uniquement de tubes d'une section moyenne de 30 μ avec une lumière d'environ 10 μ . Ces tubes confluent vers le canal pancréatique en élargissant progressivement leur lumière et représentent donc une différenciation particulière des voies excrétrices du pancréas exocrine.

À la périphérie, par contre, le diamètre des sections est plus faible (20-22 μ) et la lumière s'atténue ou devient virtuelle, les tubes prenant alors l'aspect de cordons apparemment pleins.

La nature glandulaire de cette formation est évidente. Les cellules qui la constituent, relativement volumineuses, sont prismatiques, à limites peu nettes, à noyau central à contour assez irrégulier, pauvre en chromatine et dépourvu de nucléole. Le cytoplasme assez abondant est bourré de très fines granulations fortement acidophiles après coloration par les techniques générales (triple coloration de Prenant, Mann-Dominici). Ces granulations sont, en outre, fortement fuchsinophiles, après coloration mitochondriale à base de fuchsine d'Altmann, prennent le violet de gentiane selon Bensley (après fixation alcoolique selon LANE), s'imprègnent par l'argent selon Gros-Schultze. Enfin, une activité phosphatasique assez faible est notée au niveau des cellules de la glande intrapancréatique. L'ensemble de ces résultats incite à rapprocher ces cellules des cellules A du pancréas endocrine. Cette parenté est confirmée par la technique à

l'Azan rapide de Schleicher selon GABE (1958) qui confère aux granulations en question une coloration rouge sombre plus ou moins intense après oxydation permanganique.

Entre les tubes glandulaires se rencontrent de *très petits îlots endocrines* constitués exclusivement soit de cellules A, soit de cellules B. Les îlots B sont plutôt localisés au centre de la formation intrapancréatique, et comprennent au maximum une dizaine de cellules, à noyau allongé, à cytoplasme rare, occupé dans sa partie apicale par un fin semis de granulations assez difficilement colorables par l'hématoxyline chromique, mais très nettement visibles par la fuchsine paraldéhyde après une oxydation de 4 minutes 1/2 au permanganate acide. Du fait de la localisation des grains β à l'apex des cellules, les îlots B paraissent entourés d'un liséré violacé continu, qui tranche sur le fond resté clair de la glande, et sont, de ce fait, particulièrement visibles sans coloration nucléaire. Ils ne sont jamais très nombreux, mais leur nombre augmente avec l'âge. Les îlots A sont beaucoup plus nombreux (3 à 4 fois en moyenne), mais encore plus petits que les îlots B (jamais plus de 4 à 5 cellules, et sont plutôt localisés à la périphérie de la glande intrapancréatique, mais toujours entre les tubules, jamais entre les acini exocrines. Quand ils sont bien différenciés, en fin de vie larvaire par exemple, ils se colorent vivement par l'Azan de Schleicher selon GABE, après une oxydation par le permanganate acide de 45 secondes. Le cytoplasme, rare, est alors totalement occupé par d'assez grosses granulations coalescentes, rouge vif. Dans quelques cas ces îlots A peuvent s'accoler à des îlots B, mais il n'y a jamais intrication des catégories cellulaires.

2. — Le pancréas de *Pelodytes punctatus* présente une structure tout à fait comparable à celle de l'Alyte, avec une glande intrapancréatique aussi développée.

3. — Chez *Discoglossus pictus*, par contre, il existe au centre du pancréas exocrine une formation de même nature, mais beaucoup moins développée, constituée seulement d'un *petit nombre* de tubes glandulaires ou de cordons à lumière virtuelle se rattachant également au canal pancréatique. Les caractères cytologiques et histochimiques de cette formation sont identiques à ceux de l'Alyte. Mais elle est assez fortement pigmentée et peut contenir quelques traces de glycogène. Les îlots endocrines sont toujours situés au voisinage de cette glande, soit entre les tubes, soit à l'extérieur, contre les acini exocrines. Les îlots B présentent les mêmes caractères que chez l'Alyte, mais les îlots A se colorent mal par l'Azan de Schleicher.

4. — Chez *Rana esculenta* il n'existe pas de glande intrapancréatique comme l'a décrit ARON (1925) mais seulement un développement peut-être un peu plus accusé du système canaliculaire excréteur, qui apparaît surtout en fin de croissance larvaire. Les îlots endocrines sont toujours situés au voisinage de ces canaux.

5. — Le pancréas de *Rana temporaria* et celui de *Bufo bufo* enfin pré-

sentent la structure classique qui a été décrite chez les autres espèces, c'est-à-dire que les voies excrétrices du pancréas exocrine sont très peu développées.

3° DISCUSSION ET INTERPRÉTATION

La structure du pancréas est très constante dans toute la série des Vertébrés, et les larves d'Amphibiens Anoures constituent une exception remarquable. Une disposition assez comparable, à première vue, à celle de l'Alyte ou du Pelodyte a été décrite par CLARA (1924) chez la Grive draine : le pancréas de ce Passeriforme montre en effet dans son segment splénique une formation centrale volumineuse sous une couche d'acini périphériques. Cette structure correspond en fait au rassemblement en un volumineux massif central d'un très grand nombre d'îlots endocrines, comme l'indique l'histologie comparée du pancréas de divers Oiseaux.

Bien différente est la structure tubulaire trouvée chez les Anoures, qui correspond à une hypertrophie du système canaliculaire, et qu'on peut pour cette raison rapprocher de la structure embryonnaire du pancréas au début de son histogenèse. On sait, en effet, que chez les Vertébrés supérieurs tout au moins (Oiseaux et Mammifères), le pancréas se présente aux premiers stades de sa différenciation sous l'aspect de cordons pleins, puis de tubes (cordons et tubes pancréatiques primitifs de LAGUESSE) dont la structure est comparable à celle de la glande intrapancréatique du têtard d'*Alytes* ou de *Pelodytes* et dont l'évolution endocrine confirme le rapprochement.

Il existe, en effet, pendant toute la vie larvaire de l'Alyte une évolution des tubes ou cordons de la glande intrapancréatique en îlots endocrines, qui se traduit par des figures cytologiques de transition entre cellules glandulaires et cellules insulaires. Le tube, ou segment de tube qui va subir une telle évolution se signale par une fuchsinophilie plus forte qui lui confère une teinte rouge violacé après la technique d'Altmann. Puis tandis que la lumière du tube s'atténue et disparaît, les granulations fuchsinophiles disparaissent progressivement à partir d'une des cellules du tube. Le phénomène se poursuit et donne naissance, sur coupes, à des plages cellulaires comportant une zone encore pourvue de granulations hyperchromatiques tandis que le reste du cytoplasme a perdu sa fuchsinophilie. Il gagne souvent les sections de tubes voisins et aboutit à la formation d'un petit massif endocrine, dans lequel les noyaux s'allongent et se groupent au centre tandis que le cytoplasme, réfractaire à toute coloration par la fuchsine d'Altmann acquiert ses granulations spécifiques.

Or, une évolution comparable à celle-ci a été décrite dans les « tubes pancréatiques primitifs » par LAGUESSE (1906) et ARON (1922 a). Chez les embryons de Mammifères et d'Oiseaux, à des stades précoces (avant même la différenciation des premiers acini exocrines) certaines cellules du parenchyme, alors à l'état de cordons ou de tubes « acquièrent un aspect nouveau aux colorants usuels, une métachromasie, un aspect trouble ».

Leur cytoplasme est « rempli de granulations sécrétoires fines et serrées ». Puis elles se groupent en massifs ou îlots endocrines, qui résultent « de la métamorphose de plusieurs cellules tubaires qui s'agglomèrent ».

Le parallélisme qui existe ainsi entre la structure du pancréas embryonnaire au stade des cordons et tubes pancréatiques primitifs et celle de la glande intrapancréatique du têtard d'*Alytes* ou de *Pelodytes* d'une part, l'identité de leur évolution dans le sens endocrine d'autre part, incitent évidemment à interpréter cette glande comme une structure embryonnaire persistant pendant toute la phase larvaire, qui se serait différenciée périphériquement en acini exocrines, mais dont la partie centrale aurait conservé sa structure embryonnaire, en même temps que ses potentialités évolutives dans le sens endocrine.

Je n'ai pu étudier les stades jeunes de l'histogenèse du pancréas d'*Alytes obstetricans* et de *Pelodytes punctatus*. Mais chez *Discoglossus pictus*, la structure tubulaire est encore peu différenciée au moment où s'individualisent les acini exocrines et n'acquiert un développement important qu'au début de l'allongement des bourgeons de membres postérieurs, ce qui indique qu'elle n'est pas simplement un reliquat embryonnaire, mais possède la faculté de s'accroître au début de la vie larvaire.

Enfin, la seule affinité des granulations cytoplasmiques de cette formation, pour les colorants spécifiques des cellules A du pancréas endocrine, ne permet pas de l'homologuer à une formation insulaire. D'ailleurs, il existe dans les îlots endocrines du pancréas d'*Alytes obstetricans* des cellules A typiques qui se colorent en rouge vif par l'Azan de Schleicher alors que les granulations des cellules de la glande intrapancréatique prennent une teinte rouge sombre.

III. — *La genèse des îlots endocrines.*

Deux générations d'îlots endocrines sont décrits dans le pancréas des larves d'Anoures par ARON et ALFONSI (1924) chez *Rana temporaria*; HIRATA (1934) chez *R. japonica*; FARAGGIANA (1934) chez *R. temporaria*, *R. agilis* et *Bufo vulgaris*; JANES (1938) chez *R. clamitans*, *R. catesbiana*, *R. sylvatica* et *Hyla versicolor*.

Les îlots primaires apparaissent les premiers à partir des cellules de l'ébauche pancréatique, à un stade relativement précoce qui semble correspondre au début de la croissance des bourgeons de membres postérieurs. Ils sont peu nombreux, et constitués d'un petit nombre de cellules pauvres en cytoplasme, souvent abondamment pigmentées, colorables en bleu pâle par l'azur-éosine. Elles correspondent aux cellules « basophiles » de HIRATA (1934). Ces îlots sont en réalité les îlots B.

Les îlots secondaires apparaissent plus tard, au moment de la métamorphose à partir des canaux pancréatiques (JANES, 1938). Mais il est possible qu'une partie des îlots primaires se transforment à ce moment en îlots secondaires (ARON, 1931; HIRATA, 1934; JANES, 1938). Ils sont plus nombreux que les îlots précédents, le cytoplasme de leurs cellules est

éosinophile (JANES, 1938) et fuchsinophile (HIRATA, 1934). Ils correspondraient aux îlots définitifs fonctionnels. Ce sont très certainement les îlots A.

1° MATÉRIEL ET TECHNIQUES

La différenciation des catégories cellulaires a été étudiée au cours du développement larvaire plus particulièrement chez *Alytes obstetricans* (55 cas), par les techniques précédemment indiquées.

2° RÉSULTATS

a) *Îlots B.* — A l'éclosion le pancréas présente déjà sa structure larvaire définitive, c'est-à-dire une couche périphérique d'acini exocrines et une région glandulaire centrale, tubuleuse. Mais la zone acineuse est pratiquement constituée d'une seule couche d'acini et la glande intrapancréatique est relativement plus importante qu'aux stades âgés. Des plaquettes vitellines existent encore çà et là dans quelques cellules de cette glande. A ce stade, la fuchsine paraldéhyde colore seulement les grains de sécrétion du pancréas exocrine, et aucun îlot B n'est visible. La glande intrapancréatique est faiblement granuleuse et se colore mal par l'Azan de Schleicher. Aucun îlot A n'est repérable.

— Une à deux semaines après l'éclosion l'importance de la zone acineuse par rapport à la glande intrapancréatique s'est accrue. La fuchsine paraldéhyde colore très faiblement le cytoplasme périphérique de quelques groupes de cellules situées en pleine glande intrapancréatique (fig. 40, Pl. XVIII) et qui constituent la première manifestation des îlots B. Mais la coloration violette est très pâle et diffuse.

— Ce n'est que dans la 2^e quinzaine que ces îlots B acquièrent une coloration nette par la fuchsine paraldéhyde due à une fine poussière de grains β , nettement polarisés à l'apex des cellules, c'est-à-dire à la périphérie de l'îlot, au voisinage des capillaires. Cette disposition dure pendant toute la vie larvaire jusqu'à la métamorphose. Le nombre des îlots s'est accru très lentement et à ce moment survient une *prolifération* importante, aux dépens des acini et des tubes glandulaires qui dégénèrent.

b) Les îlots A ne se forment qu'après les îlots B et leur différenciation est tellement progressive qu'il est difficile de fixer un stade précis de leur apparition.

— Jusqu'au stade II ils sont seulement repérables par leur petite taille, leur position périphérique et l'absence de coloration par la fuchsine paraldéhyde. Mais l'Azan de Schleicher ne colore pas leur cytoplasme.

— Vers le stade III, une très légère coloration rouge peut être vue par cette méthode dans une région très limitée du cytoplasme sans qu'on puisse dire si elle correspond à la présence de granulations spécifiques (fig. 39, Pl. XVIII).

— Ce n'est qu'au stade IV-V ou VI que les îlots A se colorent en tota-

lité par l'Azan de Schleicher. Mais cette coloration n'atteint son intensité maximum qu'au moment de la croissance accrue des membres postérieurs (stades XI à XIV). A ces stades, la structure granuleuse du cytoplasme est alors nettement visible et correspond à celle décrite précédemment.

En résumé, les premières granulations β apparaissent au tout début de la croissance du bourgeon de membre postérieur et leur quantité n'augmente pas sensiblement au cours de la vie larvaire. Les granulations α au contraire se forment plus tard, très progressivement et ne deviennent vraiment abondantes qu'en fin de croissance larvaire. Rappelons à ce propos que chez le *Rat* les cellules B apparaissent les premières et les grains β sont décelables dès le 19^e jour de la vie fœtale (HARD, 1944) ou 24 heures après la naissance (NERENBERG, 1954). Les cellules A n'apparaissent qu'au 2^e jour de la vie post-natale et leurs granulations seulement le 5^e jour. Au contraire, chez l'embryon de Poulet (LIÈVRE, 1957) les granulations α apparaissent les premières au 15^e jour et les granulations β seulement au 17^e jour. En outre, les deux catégories cellulaires se déchargent au cours de la première semaine qui suit l'éclosion.

IV. — Conclusion.

a) Le pancréas larvaire des Anoures présente chez quelques espèces une *particularité structurale* dont la signification est discutée. Cette « glande intrapancréatique » développée aux dépens des canaux excréteurs est très développée chez *Alytes obstetricans* et *Pelodytes punctatus*. Elle l'est beaucoup moins chez *Discoglossus pictus* et pratiquement absente chez *Rana esculenta*. De toute façon elle *disparaît* lors de la métamorphose.

b) L'*histogenèse des îlots*, étudiée chez *Alytes*, montre que contrairement aux travaux anciens utilisant des techniques banales la différenciation des cellules glandulaires A et B se fait *au cours de la vie larvaire*, les cellules B apparaissant assez brusquement au début de la formation du bourgeon de membre postérieur, les cellules A plus tard, très progressivement.

D. — Indications sur l'histogenèse de l'organe interrénal.

L'histogenèse de l'organe interrénal des Anoures est connue tout au moins dans ses premiers stades par les travaux de SRDINKO (1900), ALBRAND (1908), WITSCHI (1953 a) chez *Rana temporaria*; SOULIÉ (1903) chez *R. esculenta*; STENGER et CHARIPPER (1946), WITSCHI (1953 a, 1956), SEGAL (1953) chez *R. pipiens*; VANNINI chez *R. dalmatina* (1950), chez *Xenopus laevis* (1956).

1^o Deux conceptions s'affrontent quant à l'*origine du tissu interrénal*. Classiquement (SRDINKO, ALBRAND, SOULIÉ), il dérive d'une prolifération cellulaire de la paroi dorsale de l'épithélium cœlomique au niveau du mésentère dorsal. A la suite d'une faible migration, les cellules du blastème interrénal viennent se placer entre l'aorte dorsale et la veine cave posté-

rière. Le « mésoderme intermédiaire » au niveau du futur mésonéphros ne donne naissance qu'aux néphrons. Cette opinion est vivement défendue par VANNINI (1950) chez *Rana dalmatina* et *Xenopus laevis*.

WITSCHI (1953 a, 1956), au contraire, nie cette origine coelomique et admet, suivi par SEGAL (1953) que l'organe interrénal provient du blastème mésonéphrique qui se différencie en donnant à la fois les néphrons, les conduits uro-génitaux, la medulla des gonades (y compris les cellules interstitielles) et les cellules interrénales. Ces dernières se détachent des deux cordons blastématiques situés de chaque côté de la veine cave et viennent se loger entre elle et l'aorte en petits groupes que WITSCHI interprète comme des néphrons modifiés.

Une conception mixte est proposée par STENGER et CHARIPPER (1946) chez *Rana pipiens*. La genèse du tissu interrénal se ferait en deux temps : épaissement impair de la paroi dorsale de la cavité coelomique, qui se partage bientôt en deux cordons de chaque côté de l'aorte dorsale, puis à la fin du recouvrement des branchies externes par le repli spiraculaire l'ébauche paire s'accroît à la fois par une seconde prolifération de l'épithélium coelomique à partir du mésenchyme de la région ventrale de l'aorte.

2° Les critères histologiques de l'activité du cortex surrénal reposent essentiellement sur sa richesse en lipides et en acide ascorbique. Chez l'embryon, on admet que l'apparition de ces constituants de la cellule adulte, correspond au début du fonctionnement cortical.

a) La recherche des premières gouttelettes lipidiques dans l'organe interrénal des embryons d'Amphibiens est délicate sur coupe à congélation à cause de la dispersion de la glande. Elle ne paraît avoir été tentée que par PAWLKOWSKI (1934) chez l'Axolotl et est positive dès le moment où l'ébauche corticale se sépare de l'épithélium coelomique.

Chez les Anoures, la détection des lipides de l'organe interrénal a toujours été faite sur coupes à la paraffine après fixation dans un liquide osmié (STENGER et CHARIPPER, 1946 ; WITSCHI, 1953 a ; SEGAL, 1953 ; WITSCHI, 1956), bien que la réduction du tétroxyde d'osmium ne soit pas spécifique des lipides. Cependant, les résultats obtenus dans ces conditions confirment l'apparition précoce de lipides osmiophiles dans le cytoplasme des cellules interrénales peu après l'individualisation du blastème, au tout début de la formation du bourgeon de membre postérieur : stade 25 de *Rana pipiens*.

b) La mise en évidence de l'acide ascorbique dans les cellules interrénales n'a pas été faite chez les larves d'Anoures. Les seules indications que l'on ait intéressent l'acide ascorbique total qui a été dosé à partir de stades âgés de la vie larvaire de *Bufo vulgaris* (BUCCI, 1951).

3° Mais le meilleur critère fonctionnel du cortex surrénal est certainement sa réponse à une administration ou à une sécrétion (provoquée) d'ACTH. Elle consiste soit en une hypertrophie de la glande, soit en une sécrétion de corticostéroïdes que l'on met en évidence directement (par dosage) ou indirectement par leur action sur le glycogène hépatique par

exemple, soit en une déplétion de l'acide ascorbique. Ce dernier critère a été étudié par JAILER (1950) chez l'embryon de Mammifère, et CASE (1952) chez l'embryon de Poulet. Les résultats de ces auteurs montrent qu'en fait le cortex répond à l'ACTH, un peu après l'apparition des lipides dans les cellules interrénales.

1^o MATÉRIEL ET TECHNIQUES

L'histogenèse de l'organe interrénal a été étudiée chez *Alytes obstetricans* (21 cas) et *Bufo bufo* (19 cas) à la fois par les techniques histologiques et physiologiques qui viennent d'être indiquées.

La *détection des lipides* interrénaux n'a été faite que sur coupes à la paraffine, après fixation au Flemming et coloration de Flemming ou à la safranine.

La *recherche de l'acide ascorbique* a été tentée par la méthode de GIROUD et LEBLOND (1934) ou la variante de WALRAFF (1949).

2^o RÉSULTATS

1. — *Apparition des lipides osmiophiles* (Pl. XVIII). — a) Chez *Alytes*, à l'éclosion, l'organe interrénal est déjà bien visible histologiquement, mais ses cellules, légèrement pigmentées, ne paraissent contenir aucune substance osmiophile.

A la fin de la première semaine et au cours de la seconde, les premières gouttelettes apparaissent, mais prennent seulement une teinte grisâtre par l'acide osmique.

Quand le bourgeon de membre postérieur commence à être visible (stade I), elles deviennent vivement osmiophiles et leur diamètre et leur nombre s'accroissent. Anatomiquement, la « surrénale » du têtard devient visible sous forme d'une traînée discontinue qui part de la réunion des deux crosses aortiques et longe l'aorte dorsale, accolée à la face interne du jeune mésonéphros. A ce moment les cordons corticaux sont colonisés par des cellules ectoblastiques émigrées des ganglions sympathiques situés latéralement à l'aorte, les « sympathoblastes » de WITSCHI, irrégulièrement distribués entre les cellules interrénales, constituant les futures cellules chromaffines.

Ultérieurement (stades IV à XIII) ces cordons mixtes sont déplacés, par suite du développement du mésonéphros, et quittent la région de la veine cave où ils se sont formés. Le nombre des cellules interrénales s'accroît. Elles s'enrichissent très progressivement en lipides osmiophiles et gagnent la face ventrale du mésonéphros (stade XIV) où elles forment 2 cordons parallèles, réalisant ainsi la structure définitive de l'adulte.

b) *Bufo bufo*. — Jusqu'à la fin du recouvrement des branchies externes, le blastème interrénal est très pigmenté et, comme la plupart des tissus larvaires, riche en gouttelettes osmiophiles.

— Au début de la croissance du bourgeon de membre postérieur (stade II-III) pigment et gouttelettes disparaissent et l'acide osmique confère une teinte grise au cytoplasme des cellules interrénales.

— Ce n'est qu'au stade III âgé que l'organe acquiert sa structure définitive, avec lipides osmiophiles très nets et bien localisés.

— Comme chez *Alytes*, la croissance de l'organe interrénal est progressive et s'accompagne de la migration des cellules à la face ventrale du mésonéphros.

2. — La recherche de l'acide ascorbique dans les premiers stades du développement larvaire de l'Alyte a toujours abouti à des résultats négatifs, ou difficilement interprétables à cause de la pigmentation du blastème interrénal.

3. — L'injection ou l'administration d'ACTH à des larves de différentes espèces d'Anoures est suivie d'un dépôt de glycogène hépatique qui indique la sécrétion de glucocorticoïdes dès le début de la croissance des bourgeons de membre postérieur (les modalités de ce dépôt et les conditions expérimentales seront envisagées dans la 4^e partie de ce travail).

3^o CONCLUSION

a) L'organe interrénal des larves d'Anoures se différencie très tôt aux dépens d'un blastème embryonnaire dont l'origine est controversée.

b) Peu après son individualisation (au début de la formation des bourgeons de membres postérieurs) les cellules interrénales commencent à se charger de lipides osmiophiles. Cette charge est progressive pendant toute la vie larvaire.

c) L'acide ascorbique n'a pu être mis en évidence dans les cellules interrénales du têtard d'*Alytes obstetricans*.

d) Mais l'ACTH détermine, probablement par l'intermédiaire de glucocorticoïdes, un dépôt prématuré de glycogène hépatique.

E. — Conclusions.

1^o L'histogenèse de l'hypophyse, de la thyroïde et du pancréas larvaires chez quatre espèces d'Anoures, montre que la différenciation de ces glandes — en ce qui concerne les catégories cellulaires existant chez l'adulte — s'opère au début de la vie larvaire, à un stade précis du développement, toujours plus précoce chez *Alytes obstetricans* que chez les 3 autres espèces.

2^o L'histogenèse et la réponse de l'organe interrénal à l'ACTH indiquent également une différenciation et une possibilité d'activité à un stade au moins aussi précoce.

3^o Ces résultats ne sont pas en accord avec l'hypothèse de ARON selon laquelle la métamorphose marquerait l'entrée en fonctionnement excréteur de l'hypophyse, de la thyroïde et du pancréas endocrine, responsables du déclenchement du dépôt du glycogène hépatique.

4° L'apparition (essentiellement variable) de ce glycogène (voir 1^{re} partie) est sans rapport chronologique avec la différenciation de ces glandes à un stade précis du développement. Elle peut même avoir lieu dans certains cas — naturels ou expérimentaux — avant l'apparition des signes morphologiques de la différenciation de ces glandes.

5° Ces résultats confirment ceux obtenus à la suite des interventions expérimentales du chapitre précédent.

TROISIÈME PARTIE

EXPÉRIENCES D'ABLATION PRÉCOCE DE L'HYPOPHYSE, DE LA THYROÏDE ET DU PANCRÉAS

Ce sont évidemment les expériences d'ablation des glandes endocrines susceptibles de jouer un rôle dans un phénomène donné qui donnent les renseignements les plus sûrs, quant à leur intervention dans l'apparition de ce phénomène.

La surrénalectomie étant pratiquement irréalisable chez les larves d'Anoures, seront seules envisagées ici l'hypophysectomie, la thyroïdec-tomie et la pancréatectomie.

Ces interventions nécessitent le matériel et l'équipement classique de l'embryologie expérimentale. Les embryons sont anesthésiés par un séjour de 2 minutes dans une solution de chloréthane à 0,5 0/00. L'ablation se fait au moyen d'un microscalpel constitué d'un éclat de lame de rasoir métallique monté sur un roule-goupille. L'embryon opéré est transporté dans le liquide de Holtfreter jusqu'à cicatrisation complète, puis réins-tallé dans l'eau ordinaire d'élevage.

A. — Hypophysectomie.

L'hypophysectomie des larves d'Amphibiens est certainement la plus ancienne des interventions expérimentales consistant à supprimer une glande endocrine chez un embryon de Vertébré pour étudier les conséquences de cette absence tant du point de vue de la croissance embryonnaire que du fonctionnement des autres glandes endocrines. A ce titre, les expériences d'ADLER (1914), SMITH (1916) et ALLEN (1916) sont à l'origine de la notion de corrélations hormonales embryonnaires. Confirmées et complétées par de nombreux auteurs elles ont permis d'élucider le déterminisme jus-qu'alors mystérieux de la métamorphose. Cependant la recherche du glycogène hépatique chez les têtards hypophysectomisés ne paraît avoir été jamais envisagée.

1^o MATÉRIEL ET TECHNIQUE

J'ai réalisé l'hypophysectomie précoce chez les embryons de 3 espèces d'Anoures : *Bufo bufo*, *Rana temporaria* et *Discoglossus pictus*. Mais c'est chez cette dernière espèce que le plus grand nombre d'ablations a été fait.

Deux techniques sont possibles selon le stade auquel on opère :

a) L'une consiste à enlever la placode épithéliale hypophysaire avant, ou au moment de son invagination sous l'encéphale au stade du bourgeon caudal. C'est celle qu'ont utilisée SMITH (1916), ALLEN (1916), BLOUNT (1932) et qui est préconisée par RUGH (1948).

b) Une autre technique procède à un stade moins précoce et consiste à ôter l'ébauche hypophysaire une fois son invagination terminée, alors qu'elle s'est libérée de l'épiblaste qui lui a donné naissance et qu'elle vient s'appliquer contre la paroi ventrale du diencéphale.

J'ai utilisé les 2 procédés. Le premier nécessite le dégantage des embryons et a l'inconvénient d'être « aveugle ». Le second, au contraire, correspond à l'ablation d'un petit massif cellulaire déjà bien différencié anatomiquement et très facilement repérable. Mais il n'est pas non plus automatique en ce sens qu'il peut laisser en place quelques cellules collées à l'infundibulum, que l'on retrouve sur coupe histologique.

Le premier procédé étant connu, je décrirai rapidement le second.

L'ablation se fait au stade 18-19 de *Discoglossus pictus*, 11-12 de *Rana temporaria* et III₃-III₄ de *Bufo bufo*.

Une série de coupes histologiques sagittales, à ces stades, a permis de repérer l'ébauche hypophysaire.

Une incision frontale est faite juste au-dessus de la membrane pharyngienne de façon à séparer l'encéphale du pharynx sans léser l'épithélium fragile de ces 2 ébauches. Avec quelque habitude, cette ouverture laisse l'hypophyse en place, accolée à l'épithélium infundibulaire. L'hypophyse est alors séparée de cet épithélium et la paroi ventrale du diencéphale examinée et au besoin râclée au microscalpel pour éliminer les éléments hypophysaires qui auraient pu rester adhérents. En général, d'ailleurs, l'hypophyse se décolle en bloc et cette précaution — dange-reuse — se révèle inutile.

Le têtard est transporté dans le liquide de Holtfreter : les deux lèvres de l'incision s'accrochent au bout de 10 à 15 minutes et la cicatrisation est terminée dans l'heure qui suit l'intervention.

La mortalité post-opératoire est pratiquement nulle chez le *Discoglossus*. Cependant, bien que la cicatrisation soit rapide et totale, elle détermine souvent une déformation de la région buccale, l'ouverture de la bouche étant dirigée dorsalement et surplombée par l'extrémité antérieure de la tête. Les larves atteintes d'une telle malformation ont évidemment des difficultés à s'alimenter, leur croissance est très ralentie et le plus souvent elles meurent au bout d'un mois. Celles qui subsistent sont très amaigries et végètent jusqu'à 2 ou 3 mois. Par contre, les têtards chez lesquels cette anomalie n'existe pas — ou peu — se développent norma-

lement et peuvent vivre pendant plus d'un an, bien que leur croissance soit plus lente et leur taille toujours plus faible que celle des témoins.

Chez *Rana temporaria* et *Bufo bufo*, au contraire, la mortalité post-opératoire est importante. Les tissus embryonnaires sont plus fragiles, l'incision destinée à mettre à nu l'ébauche hypophysaire n'est pas franche, la cicatrisation se fait mal et souvent des excroissances cellulaires se forment au niveau de la plaie, bourgeonnent et sont le siège d'infections bactériennes.

2° RÉSULTATS (Pl. XIX, fig. 41-42)

La recherche du glycogène hépatique chez des têtards hypophysectomisés a été faite chez *Discoglossus pictus* uniquement sur coupes, de 1 mois à 18 mois après l'opération. Un petit nombre de dosages a été effectué sur des larves de *Rana temporaria* et *Bufo bufo* d'une taille plus grande. Sauf indications contraires, les têtards ont une nourriture normale (salade cuite, foie cru).

1. — RÉSULTATS QUALITATIFS

a) 59 têtards de *Discoglossus pictus* ont été fixés 1 mois au moins après l'opération. 15 d'entre eux ont été conservés pendant plus d'un an et un autre était toujours vivant au bout de 18 mois (tableau XVI).

Le glycogène n'est présent de façon constante que chez les larves âgées. Par contre, chez les larves jeunes, les résultats sont très variables comme ils le sont chez les têtards normaux. De toute façon, l'hypophysectomie ne s'oppose pas au dépôt du glycogène hépatique et, dans les cas positifs, la quantité de glycogène décelée histochimiquement est comparable à celle des têtards témoins non hypophysectomisés.

b) Par contre 18 têtards à anomalies buccales importantes, se nourrissant mal et à croissance pratiquement stoppée fixés 3 semaines à 1 mois après l'hypophysectomie ne montrent quelques traces de glycogène que dans 5 cas. Les 13 autres en sont totalement dépourvus.

TABLEAU XVI

Discoglossus pictus. Hypophysectomie.

Nombre de larves	Age	Stade	Résultat
43	1 à 2 mois	O à IV	13 — 5 tr 10 + 15 ++
15	13 mois	V à X	3 + 5 ++ 7 +++
1	18 mois	XI	+++

c) En outre l'hypophysectomie ne s'oppose pas non plus au stockage massif qui se produit chez les témoins à la suite d'un régime alimentaire riche en glucides.

17 larves sont immergées 20 jours après l'opération dans une solution de glucose à 4 0/00 pendant 72 heures. Leur foie se charge en glycogène comme en présence d'hypophyse (fig. 42, planche XIX).

6 autres sont élevées en présence d'amidon à 4 0/00 pendant 48 heures et montrent également un dépôt massif.

d) Enfin 10 têtards à malformations buccales de la 2^e série, chez lesquels l'absence de glycogène a été imputée à l'absence de nourriture, immergés dans une « solution » d'amidon à 4 0/00 pendant 72 heures présentent une richesse en glycogène importante, bien que plus faible que celle observée chez les larves sans anomalies.

2. — RÉSULTATS QUANTITATIFS

Le faible poids du foie des têtards de *Rana temporaria* ou de *Bufo bufo*, de l'ordre de 3 à 4 milligrammes au moment du dosage, nécessite l'emploi de plusieurs animaux (au moins 3 ou 4) pour satisfaire aux conditions imposées par la microméthode de HERBAIN (12 à 15 milligrammes de tissu hépatique). C'est là un inconvénient en ce sens qu'il suffit que l'un des têtards ne soit pas complètement hypophysectomisé pour rendre sans valeur le résultat du dosage. Or la réussite de l'hypophysectomie ne peut être vérifiée que sur coupes, *a posteriori*.

a) *Rana temporaria*.

14 têtards opérés, provenant d'œufs pondus en mars 1957 et présentant la pigmentation caractéristique des hypophysectomisés ont été utilisés pour dosages en 3 séries de 5,5 et 4 animaux respectivement, en juillet de la même année.

Les têtes ont été fixées pour contrôle histologique ; 1 des têtards de la 1^{re} série et 2 de la 2^e montrent des restes hypophysaires en position aberrante. Seule la 3^e série est constituée uniquement d'hypophysectomisés totaux. Les résultats sont les suivants :

Série	Nombre d'animaux	Poids des foies (mg.)	Glycogène (o/o)	Témoins
1	5	14,7	0,71	0,17
2	5	13,2	0,24	non dosable
3	4	10,0	0,55	non dosable

b) *Bufo bufo*.

Des 3 séries de 3 têtards provenant d'œufs pondus fin février 1957 et dosés en juillet, 2 seulement sont valables, la 3^e comprenant une larve incomplètement hypophysectomisée.

Série	Nombre d'animaux	Poids des foies (mg.)	(Glycogène o/o)	Témoins
1	3	10,6	2,03	3,04
2	3	9,4	2,27	
3	3	11,1	2,84	

3. — CONCLUSION

L'hypophysectomie ne s'oppose donc pas au stockage du glycogène hépatique par les larves d'Anoures. Histochimiquement la présence de glycogène n'est certes pas générale dans le foie des hypophysectomisés jeunes. Mais il en est de même chez les têtards normaux, (cf. 1^{re} partie) et j'ai montré que chez ces derniers la richesse du foie en glycogène était essentiellement variable en fonction des conditions alimentaires des larves. Or un grand nombre de ces têtards hypophysectomisés ont en outre une malformation buccale qui rend la prise de nourriture difficile. Par contre, tous les têtards âgés sont riches en glycogène.

Les dosages confirment les données histochimiques, mais les valeurs numériques sont d'un intérêt relatif pour les mêmes raisons. En outre, le petit nombre de résultats ne permet pas une généralisation selon laquelle chez *Rana temporaria*, l'hypophysectomie se traduirait par une augmentation du taux du glycogène hépatique, alors qu'elle serait marquée par une légère diminution chez *Bufo bufo*. La conclusion de ces dosages est d'indiquer la présence de glycogène dans le foie des hypophysectomisés en quantité comparable à celle des témoins.

Enfin l'hypophyse larvaire n'est pas nécessaire au stockage particulièrement important qui se produit quand l'alimentation est riche en glucides (glucose, amidon).

B. — Thyroïdectomie.

Bien que la thyroïdectomie des larves d'Anoures ait été réalisée chez l'embryon il y a plus de quarante ans (ALLEN, 1916, 1917), HOSKINS, 1917, 1918) et répétée depuis par de nombreux auteurs, aucune indication n'existe quant au glycogène hépatique des têtards sans thyroïde.

1^o TECHNIQUE

La thyroïdectomie a été faite chez *Discoglossus pictus*, *Rana temporaria* et *Bufo bufo*.

L'ébauche thyroïdienne est repérée à partir du stade du bourgeon caudal sur coupes histologiques.

Son ablation se fait sensiblement aux mêmes stades que celle de l'hypophyse.

Elle nécessite une incision transversale juste en avant de l'ébauche car-

diaque. L'ouverture ainsi faite atteint le plancher pharyngien sans le léser. Elle découvre le diverticule thyroïdien sous forme d'un petit cordon blanc, appendu à la région antérieure de l'épithélium entoblastique ventral et dirigé vers l'arrière. Cette ébauche est coupée à sa base. Pour plus de sécurité, dans certains cas, la région épithéliale pharyngienne voisine du diverticule thyroïdien est ôtée en même temps.

La précaution essentielle dans cette technique réside dans le respect de l'intégrité de l'ébauche cardiaque : une ouverture trop postérieure détermine la saillie de cette ébauche et la mort de l'embryon.

2° RÉSULTATS

La *mortalité* post-opératoire est importante même chez le Discoglosse. Elle débute une dizaine de jours après l'intervention chez des larves immobiles, de taille réduite et qui présentent une diminution de la hauteur de la nageoire caudale, probablement due à un défaut d'irrigation. Ce n'est qu'exceptionnellement que j'ai pu conserver des larves d'aspect normal et se nourrissant bien, au-delà de 6 mois (5 cas chez *Discoglossus pictus*). Ces cas mis à part, les résultats qui vont suivre portent sur des larves jeunes, fixées au plus un mois après l'opération et dont l'alimentation est difficile.

Plus encore qu'après hypophysectomie, un *contrôle histologique* s'avère indispensable, pour dépister les restes thyroïdiens éventuels. Il est, en effet, fréquent d'observer une régénération de la glande à partir de l'épithélium pharyngien quand celui-ci n'a pas été enlevé au voisinage de l'ébauche thyroïdienne. Dans ce cas, la migration de l'ébauche vers la région cardiaque ne se fait plus et il est possible de trouver le régénérat en position atypique, par exemple à l'extrémité antérieure de la mâchoire inférieure, contre les lèvres buccales.

Inversement, les thyroïdectomies totales réalisées en enlevant largement l'épithélium pharyngien alentour du bourgeon thyroïdien s'accompagnent de *déformations* du pharynx qui gênent l'alimentation des larves et dont il faut tenir compte dans l'interprétation des résultats.

1. — Thyroïdectomisés élevés dans des conditions alimentaires normales.

L'examen histologique montre des restes thyroïdiens chez 3 des 15 *Discoglossus pictus* opérés, 2 des 6 *Rana temporaria* et 1 des 3 *Bufo bufo*. Après thyroïdectomie les résultats sont les suivants :

<i>Discoglossus pictus</i> . . .	{	5 + 7 —
<i>Bufo bufo</i>		2 tr.
<i>Rana temporaria</i> . . .		4 —

2. — *Thyroidectomisés élevés*
en présence de glucose à 5 0/00 (fig. 47, planche XIX).

La thyroidectomie n'est totale que chez 22 *Discoglossus pictus*, 2 *Rana temporaria* et 7 *Bufo bufo*.

<i>Discoglossus pictus</i> . . .	{	12	+
		6	+
		4	
<i>Bufo bufo</i>	{	4	+-
		3	+
<i>Rana temporaria</i> . . .	{	1	+
		1	tr.

3. — *Thyroidectomisés élevés*
en présence d'amidon à 5 0/00.

Discoglossus pictus (6 cas) : 2 têtards ont un foie riche en glycogène, sans que cette accumulation corresponde cependant à la surcharge obtenue dans les mêmes conditions chez les témoins. Les 4 autres montrent un dépôt beaucoup plus faible.

3° CONCLUSION

Comme l'hypophyse, la *thyroïde n'est pas indispensable* au dépôt du glycogène dans le foie des larves d'Anoures. Cependant les résultats sont moins nets qu'après hypophysectomie en ce sens qu'un plus grand nombre de têtards thyroidectomisés sont dépourvus de glycogène, et que chez ceux qui en sont pourvus, la teneur paraît plus faible. Faut-il en conclure une intervention relativement discrète de la thyroïde dans la genèse de ce glycogène ? L'action des antithyroïdiens et de la thyroxine permettra de préciser ce rôle éventuel.

Il ne faut cependant pas oublier que la thyroidectomie nécessite une intervention opératoire, et une lésion, au niveau du plancher pharyngien, dont les conséquences sur l'alimentation des larves ont été signalées. De plus, la survie des têtards thyroidectomisés est difficile et le taux de mortalité élevé à tous les stades. Ces deux faits, à eux seuls, peuvent suffire à expliquer l'absence relativement fréquente de glycogène hépatique ou la teneur relativement faible, chez les animaux opérés.

4° ANTITHYROÏDIENS

Dès leur découverte par ASTWOOD (1943) les antithyroïdiens de synthèse du groupe des thiourées et thiouraciles ont été utilisés dans l'étude de la fonction thyroïdienne des larves d'Anoures. Les recherches de GORDON, GOLDSMITH et CHARIPPER (1943, 1945) ont établi que la thiourée

agit en inhibant la production d'hormone thyroïdienne et produit des effets comparables à ceux qui suivent la thyroïdectomie. Les têtards traités à la thiourée, comme ceux traités au thiouracile (HUGUES et ASTWOOD, 1944) ne se métamorphosent pas, même quand on leur administre une quantité d'hormone thyroïdienne suffisante pour déclencher la métamorphose des témoins. Ces larves, par contre, réagissent à la thyroxine en se métamorphosant (STEINMETZ, 1954) ce qui démontre bien que l'inhibition de la métamorphose par les antithyroïdiens est due à une action d'opposition à la synthèse (ou à l'excrétion) des hormones thyroïdiennes.

Il était donc intéressant de rechercher la présence de glycogène dans le foie des têtards d'Anoures traités par la thiourée ou le thiouracile, en l'absence d'hormones thyroïdiennes circulantes, c'est-à-dire chez des larves ayant subi une « thyroïdectomie chimique ».

1. — *Technique.*

Il résulte des travaux de GORDON, GOLDSMITH et CHARIPPER (1943, 1945) et STEINMETZ (1954) sur la thiourée et de ceux de STEINMETZ (1950, 1952, 1954) sur le thiouracile, que ces deux substances exercent leur action antithyroïdienne avec le minimum d'effet toxique quand on les ajoute à l'eau d'élevage à la concentration de 0,3 0/00. A cette concentration, la thiourée se dissout complètement, non le thiouracile. DELSOL (1952) obtient une dissolution totale du thiouracile en portant quelques minutes à l'ébullition une solution 2 à 3 fois plus concentrée (0,75 à 1 0/00). Mais WILLIAMS, JANDORF et KAY (1944) ont montré que dans ces conditions le thiouracile perd environ 20 0/0 de son activité et la solution se décompose lentement à température ordinaire, ce qui fait que les concentrations utilisées par DELSOL chez le Discoglosse correspondent à peu près à celle des auteurs précités.

Le traitement aux antithyroïdiens a commencé après la formation complète du spiracle (stade O de TAYLOR et KOLLROSS). Les têtards de *Discoglossus pictus* ont été soumis au thiouracile selon DELSOL, ceux de *Rana temporaria*, *Rana esculenta*, *Bufo bufo* et *Alytes obstetricans* à la thiourée. Les dernières fixations ont été faites 6 mois après le début des expériences. L'alimentation est normale (salade cuite, foie cru).

2. — *Résultats* (tableaux XVII et XVIII).

A la concentration de 0,3 0/00, la mortalité est nulle. La croissance des larves est normale, peut-être même plus active que celle des témoins. Elles se nourrissent abondamment.

L'action toxique des antithyroïdiens se manifeste morphologiquement par une déformation de la queue qui se coude en S à sa base dans le plan vertical et qui apparaît et s'accuse au cours d'un traitement prolongé. Histologiquement, le foie des traités est congestionné.

TABLEAU XVII
Antithyroïdiens de synthèse.

	Durée	Stade	Résultat	Témoins
<i>Alytes obstetricans</i>	1 mois	III	5 ++	3 — 2 +
	45 jours	IV	2 ++ 3 +++	2 + 3 ++
<i>Rana temporaria</i>	1 mois	IV	5 ++	5 — 1 —
	45 jours	VI	1 ++ 4 +++	1 tr 1 +
	2 mois 1/2	XII	2 +++ 3 ++++	2 + 3 ++
<i>Bufo bufo</i>	1 mois	IV	3 ++ 2 ++++	1 — 1 tr 3 +
	45 jours	IV-V	5 ++	1 + 4 ++
	2 mois	V-VI	2 ++ 3 +++	3 ++ 2 +++
<i>Discoglossus pictus</i>	25 jours	II-III	2 tr 3 +	5 +
	1 mois	III-IV	1 + 4 ++	2 + 3 ++
	2 mois	IX	3 ++ 2 + + +	1 + 4 + +

L'influence des antithyroïdiens sur le *glycogène hépatique* au cours des premiers jours du traitement n'a été suivie que chez *Rana esculenta* (tableau XVIII). Alors que les témoins montrent des quantités de glycogène variables, les traités en sont tous dépourvus pendant les 5 premiers jours. Les observations ont été reprises 3 semaines après, et à ce moment, le foie des traités est riche en glycogène, comme celui des témoins.

Chez les autres espèces à partir du même délai, tous les têtards examinés présentent une teneur en glycogène hépatique importante, souvent supérieure — histochimiquement — à celle des témoins (tableau XVII et fig. 48, planche XIX).

3. — *Interprétation et conclusion.*

L'action des antithyroïdiens de synthèse sur le métabolisme glucidique des Vertébrés adultes a donné lieu à des résultats contradictoires.

Il est probable que les différences constatées sont dues à des effets variables des antithyroïdiens sur le métabolisme glucidique en fonction du mode d'administration et des doses utilisées. Il ne faut pas oublier, en outre, l'action toxique de ces substances qui s'ajoute à celle du blocage

thyroïdien. Or la plupart des résultats obtenus chez les Mammifères l'ont été avec des doses importantes, manifestement toxiques, amenant la mort des animaux au cours d'une phase hypoglycémique fatale.

Les résultats obtenus chez les Anoures confirment ceux de la thyroïdectomie « chirurgicale » : en l'absence d'hormones thyroïdiennes libres, le foie est capable d'accumuler du glycogène. Ils les complètent dans la mesure où la « thyroïdectomie chimique » n'implique pas de lésions du tube digestif pouvant retentir sur le dépôt du glycogène hépatique, en montrant que ce dépôt est au moins égal à celui des témoins. Dans la plupart des cas il paraît même plus important, mais il se peut que cet accroissement particulier soit une conséquence de l'effet toxique des anti-thyroïdiens de synthèse (cf. la congestion du foie) quoique les têtards traités puissent être conservés dans d'excellentes conditions de croissance et de nutrition pendant plus d'un an.

C. — Pancréatectomie.

La *pancréatectomie* des larves d'Amphibiens n'a été réalisée que dans un tout petit nombre de cas pour tenter de résoudre expérimentalement deux problèmes très différents.

Recherchant l'*origine embryologique* des îlots de Langerhans, WOLFF-HEIDEGGER (1936, 1937) procède à une ablation *sélective* de l'ébauche pancréatique dorsale ou ventrale aux stades neurula ou bourgeon caudal, chez *Bombinator pachypus*, *Rana esculenta* et divers Crapauds. L'ablation de l'ébauche dorsale entraîne l'absence complète d'éléments endocrines dans le pancréas né de l'ébauche ventrale restée en place. Mais d'une part la recherche du glycogène hépatique n'a pas été envisagée et, d'autre part, il ne semble pas que l'auteur allemand ait réussi à obtenir des têtards isolés sans îlots de Langerhans. Pour éviter une éventuelle déficience insulinique, ou bien il greffe l'ébauche dorsale dans la région caudale, ou bien il associe deux têtards en parabiose et procède à l'ablation de l'ébauche dorsale sur l'un des conjoints seulement.

La *pancréatectomie totale* ne paraît avoir été réalisée que par ARON (1928 a, 1931) pour vérifier l'*hypothèse hormonale de l'apparition du glycogène hépatique*. Les conditions techniques en sont mal précisées. « Chez plusieurs larves ⁽¹⁾, l'opération réalisée au début de la métamorphose, toutes les fois qu'on réussit à enlever la glande en totalité, empêche l'entrée en jeu de la fonction glycogénique » (ARON, 1928 a). Ce premier résultat confirme le rôle du pancréas dans le dépôt du glycogène hépatique qui avait été suggéré par la concomitance de ce dépôt et de l'histogénèse des îlots de 2^e génération. Mais le pancréas ne serait qu'un *relais* par lequel s'exerce l'influence de la thyroïde mise en évidence par l'apparition prématurée de glycogène dans le foie après administration de

(1) Il s'agit probablement de *Rana temporaria*, *Rana esculenta* ou *Bufo vulgaris*.

thyroxine. En effet (ARON, 1931) l'ablation totale du pancréas « chez un certain nombre de larves de *Rana fusca*, une fois atteinte une taille suffisante pour que l'opération soit rendue matériellement praticable » n'est plus suivie par une accumulation de glycogène hépatique après traitement par la thyroïde fraîche ou la thyroxine. « Si l'extirpation du pancréas est réalisée alors que le foie renferme déjà une certaine quantité de glycogène, celle-ci n'augmente pas comme chez les témoins sous l'effet de l'hormone thyroïdienne. »

1^o MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Les seules indications techniques publiées, relatives à la pancréatectomie des larves d'Amphibiens, sont celles de WOLFF-HEIDEGGER (1936) qui ne concernent qu'une pancréatectomie partielle, localisée à l'ablation de l'ébauche dorsale ou de l'ébauche ventrale chez *Bombinator pachypus*.

L'ébauche dorsale est un épaississement du toit de l'intestin moyen, à peu près au niveau de l'anse hépatique. Elle est enlevée en incisant une assez large portion dorsale de l'embryon qui atteint la cavité intestinale en comprenant une partie importante de la moelle épinière, de la chorde et des somites.

L'ébauche ventrale qui naît d'un bourgeon dorsal du diverticule hépatique est abordée ventralement et son ablation est faite en même temps que la plus grande partie de l'ébauche hépatique.

Les animaux opérés présentent dans les 2 séries des malformations importantes.

a) J'ai procédé à l'ablation du pancréas sur plus de 200 larves de *DiscoGLOSSUS pictus*. Cette intervention expérimentale a nécessité une étude anatomique et embryologique préliminaire destinée à préciser, chez cette espèce, la localisation et l'évolution des ébauches pancréatiques (¹).

Le pancréas dorsal apparaît au stade 18 sous la forme d'un léger épaississement du toit du tube digestif, en arrière du diverticule hépatique. Cette ébauche s'accroît beaucoup au stade 20, surtout vers l'arrière, et latéralement sur le côté droit vers le pancréas ventral. Celui-ci s'ébauche au stade 19 par un unique bourgeon (droit), né de la paroi du diverticule hépatique de ce côté. Il s'accroît dorsalement et vers l'arrière, en direction du pancréas dorsal avec lequel il fusionne au stade 21.

b) La pancréatectomie a été faite soit *avant* la fusion des 2 ébauches (stades 18, 19, 20) soit *peu de temps après* cette fusion (stade 24) soit *plus tardivement* (stade 28).

- *Avant la fusion des 2 ébauches*, le pancréas ventral est ôté dans un premier temps selon la technique de WOLFF-HEIDEGGER, par deux incisions en V dont la pointe atteint la cavité intestinale. Dans un deuxième temps, le toit de l'intestin est décollé de l'ébauche chordale sur une étendue suffisante pour comprendre l'ébauche dorsale. Ce procédé laisse intacte

(¹) Cette étude préliminaire, non encore publiée, a été faite par Mlle BIRON.

la chorde et la moelle épinière, mais il supprime la plus grande partie de l'ébauche hépatique. Les inconvénients résultent surtout d'une possibilité de régénération importante à partir de l'ébauche dorsale quand l'ablation n'a pas été assez large.

— *Après la fusion des ébauches pancréatiques dorsale et ventrale*, au stade 21, l'intestin commence à s'individualiser. Il cesse d'être rectiligne et présente au stade 24 un coude bien marqué qui rejette l'ébauche hépatique sur le côté droit et enserre juste en arrière le pancréas bien différencié anatomiquement. A ce stade ces organes sont bien visibles par transparence, mais la pancréatectomie totale ne peut guère être réalisée qu'en procédant en même temps à l'ablation de l'anse intestinale et de la partie postérieure du foie (fig. 44, planche XIX).

Dans les 2 cas la pancréatectomie nécessite donc l'interruption de l'intestin et la perte d'une partie plus ou moins importante du foie. La cicatrisation se fait cependant assez rapidement (quelques heures) et il arrive souvent que les deux extrémités de l'intestin se mettent en contact et reconstituent un tube digestif continu, mais réduit en longueur, et privé de la plus grande partie de ses circonvolutions.

— Enfin une dernière série d'ablations a été faite plus tardivement au stade 28. A ce moment, l'anatomie du têtard est à peu près définitive et le pancréas est bien visible sur le côté droit de l'animal à l'intérieur de l'anse intestinale. L'ablation sélective peut être faite par une petite ouverture de la paroi du corps par laquelle on fait saillir l'ensemble pancréas-intestin. Le pancréas est retiré à la pince fine aussi complètement que possible. Puis l'intestin est remis en place.

Deux inconvénients sont attachés à cette technique : d'une part une hémorragie relativement importante, due à ce que la circulation pancréatique est déjà bien établie à ce stade, d'autre part, la difficulté de réaliser une ablation totale sans lésions hépatiques et hémorragie grave, à cause d'un petit pédicule pancréatique qui s'insinue entre les lobes du foie le long du cholédoque jusqu'à la vésicule biliaire.

2^o RÉSULTATS (fig. 43 à 46, planche XIX)

1^o *Aucune pancréatectomie totale*, accompagnée d'une survie de plus de 48 heures n'a pu être obtenue par le dernier procédé, à partir de larves relativement âgées, alors que ARON indique que les têtards de *Rana* supportent bien une telle intervention et peuvent même se métamorphoser sans pancréas.

Tous les animaux observés (11 cas) de 48 heures à 1 semaine après l'opération présentent des restes pancréatiques importants dans la région juxta-hépatique.

2^o *Tous les cas de pancréatectomie totale* ont été enregistrés à partir de têtards opérés à des *stades jeunes* (stades 18, 19, 20 ou 24 de *Discoglossus pictus*). L'opération qui nécessite une large ablation de l'intestin et du foie

se traduit par des malformations importantes du tube digestif (absence de différenciation et d'enroulement, longueur très réduite) qui empêchent ou gênent beaucoup l'alimentation de la larve, et entraînent une assez forte mortalité post-opératoire. Néanmoins, une centaine de survies de l'ordre de 2 à 3 semaines peut être obtenue en partant d'un nombre suffisant d'animaux opérés.

Un examen histologique minutieux est nécessaire pour vérifier la réussite d'une pancréatectomie totale. L'opération, brutale, peut amener — si elle n'est pas réussie — un déplacement du fragment d'ébauche non ôté, que l'on retrouve sur coupes en position aberrante. Le plus souvent c'est la partie postérieure de l'ébauche dorsale qui subsiste en partie et qui se présente assez loin en arrière du foie, parfois sous forme de groupes d'acini accolés à la paroi intestinale. Exceptionnellement, l'ébauche ventrale incomplètement enlevée et dissociée par l'incision, persiste à l'état d'acini isolés, disséminés dans le parenchyme hépatique.

Au total, la proportion des pancréatectomies totales ne dépasse pas la moitié des survivants.

a) *Pancréatectomisés soumis à une alimentation normale* (fig. 45).

22 animaux ont survécu pendant une quinzaine de jours et sont fixés au bout de ce délai.

5 présentent des restes pancréatiques importants.

4 seulement quelques acini isolés, épars le long de l'intestin ou des canaux biliaires, et peut-être quelques cellules endocrines disséminées et difficilement identifiables.

Les 13 autres sont totalement dépourvus de pancréas. Leur intestin est très anormal. Le plus souvent il constitue un segment rectiligne de gros diamètre, occupant à peu près toute la cavité générale, à épithélium aplati, peu différencié, contre lequel on distingue le foie très réduit en volume et de structure atypique.

Dans d'autres cas, un enroulement réduit s'est produit dans la partie postérieure de l'intestin, mais la région antérieure est droite, de diamètre à peu près normal, et à épithélium sub-normal.

Dans tous les cas les animaux restent de petite taille, s'alimentent peu ou mal, et présentent un aspect aberrant : par absence d'enroulement intestinal, ou par augmentation de volume du liquide péritonéal. Le foie est toujours de petite taille, sa position anatomique est souvent aberrante, et par sa structure histologique difficilement identifiable. Il est compact, peu vascularisé et très fortement pigmenté.

Le glycogène y est *absent* dans 4 cas, *présent* mais en très faible quantité (dans quelques cellules) dans 3 cas. L'accumulation n'est vraiment *importante* (quoique réduite comparativement aux témoins) que dans 6 cas, où les anomalies de l'intestin sont les moins fortes.

b) *Pancréatectomisés soumis à un régime glucosé* (fig. 46).

A priori, la rareté ou l'absence de glycogène dans le foie des pancréatectomisés confirment les résultats de ARON (1928 a) et le rôle du pancréas dans la genèse du glycogène hépatique.

En fait, l'ablation du pancréas telle qu'on est obligé de la pratiquer aux stades jeunes constitue une intervention expérimentale complexe. Les anomalies intestinales consécutives à l'opération peuvent tout aussi bien expliquer l'absence de glycogène. En effet les animaux ne se nourrissent pas, ou mal, et leur intestin est peu apte à une absorption normale.

Pour pallier, dans la mesure du possible, cette absence de glycogène d'origine alimentaire, on peut élever les têtards pancréatectomisés dans une solution glucosée. 26 animaux opérés sont immergés 8 jours après l'ablation du pancréas dans du glucose à 4 ou 5 0/00 pendant 48 heures.

7 présentent des restes pancréatiques importants.

5 quelques acini ou cellules insulaires isolés.

14 sont totalement pancréatectomisés. Les caractères de l'intestin et du foie sont tout à fait comparables à ceux décrits dans le paragraphe précédent. *Tous présentent un dépôt de glycogène hépatique*, net, mais qui n'atteint jamais dans les cas les plus favorables l'intensité observée chez les témoins dans les mêmes conditions. Comme chez les pancréatectomisés nourris normalement, le dépôt maximum est obtenu chez les têtards qui présentent les anomalies les moins importantes de l'intestin.

Ces résultats prouvent donc qu'il est possible d'obtenir un dépôt glycogénique en l'absence du pancréas. Le fait que ce dépôt soit nettement moins important, dans les mêmes conditions d'alimentation, que chez les témoins, doit trouver son explication dans les malformations intestinales qui rendent l'alimentation et l'absorption difficiles.

3° CONCLUSION

La présence de glycogène en quantité importante dans le foie des têtards pancréatectomisés indique que le pancréas n'est pas nécessaire à ce dépôt. Mais il est bien évident que l'ablation du pancréas, telle qu'elle a été pratiquée, et en dehors de l'absence des hormones insulaires, retentit *indirectement* sur le métabolisme hydrocarboné : d'une part, par les *anomalies de l'intestin* qu'elle détermine et qui influent nécessairement sur l'absorption, d'autre part, en supprimant avec le pancréas exocrine une source de *diastases* particulièrement importante dans la digestion des glucides en particulier. Ces deux phénomènes à eux seuls peuvent suffire à expliquer la richesse plus faible du foie des têtards pancréatectomisés par rapport aux témoins, et la moins grande facilité des opérés à stocker le glycogène en présence de glucose. Ces facteurs secondaires n'interviennent pas chez le fœtus de Rat pancréatectomisé (JOST et JACQUOT, 1955) dont le foie se charge normalement en glycogène.

QUATRIÈME PARTIE

ADMINISTRATIONS HORMONALES

Si l'installation de la fonction glycogénique du foie larvaire est contrôlée par un mécanisme hormonal, l'administration aux larves des hormones qui interviennent dans l'apparition et le stockage du glycogène hépatique doit retentir sur ces deux phénomènes. En particulier, il doit être possible de provoquer dans certaines conditions une *apparition précoce* à des stades où l'on sait que la synthèse est déjà possible (cf. apparition précoce en milieu glucosé, par exemple), ou tout au moins d'*accroître* dans une certaine mesure le glycogène déjà présent.

De telles expériences ont été réalisées depuis une vingtaine d'années sur l'embryon de Poulet (cf. Introduction) mais n'ont pas permis, à elles seules, d'élucider le problème, à cause de la divergence des résultats obtenus. Une des difficultés de cette méthode réside, en effet, dans le choix, arbitraire, des doses hormonales. Or les résultats peuvent être totalement différents, et donner lieu à des interprétations complètement opposées en fonction de la quantité de produit administré et, pour une même quantité, en fonction du stade d'application. De plus, en admettant même qu'une substance hormonale puisse agir directement sur le foie et le glycogène, et non pas à la suite d'une série d'interactions complexes mettant en jeu d'autres sécrétions hormonales, il n'en est pas moins vrai que des actions secondaires peuvent masquer l'effet primaire du produit étudié. Comme il est, en outre, difficile — sinon impossible — de prévoir quelles sont les doses « physiologiques », on conçoit la valeur toute relative des résultats apportés par l'administration de produits hormonaux et les difficultés d'interprétation qu'elle soulève.

Dans les expériences qui vont être rapportées au cours de ce chapitre, l'administration hormonale a été faite généralement en *solution* dans l'eau d'élevage renouvelée tous les jours, l'absorption se produisant à la fois au niveau des branchies et de l'intestin (si l'hormone n'est pas détruite au cours de la digestion). Dans ce dernier cas et chez des têtards de plus grosse taille (*Alytes obstetricans*) le produit hormonal est *injecté* par le spiracle dans la cavité branchiale. L'animal n'est remis dans l'eau d'élevage que 1 à 2 minutes après l'injection, pour permettre une pénétration suffisante au niveau de l'épithélium branchial.

Les doses administrées ont été calculées d'après les travaux antérieurs effectués chez les larves d'Amphibiens ou dans les autres classes de Vertébrés ; sinon elles ont été déterminées empiriquement.

Sauf indications contraires, les têtards n'ont reçu aucune alimentation avant et pendant le traitement hormonal, pour éliminer la glycogénèse d'origine alimentaire. Dans ces conditions toute apparition de glycogène hépatique aura une origine uniquement endogène.

A. — Thyroxine.

L'apparition prématurée du glycogène hépatique sous l'influence de la thyroxine, chez les têtards d'Anoures, est l'un des arguments majeurs de la théorie hormonale de ARON. Ce dépôt est obtenu chez de petites larves de *Rana esculenta* de 13-14 millimètres de longueur totale, deux jours après l'administration de thyroïde fraîche : ARON (1928 b). Le foie jusqu'alors dépourvu de glycogène s'en charge en abondance.

FONTES et ARON (1929) confirment ce résultat chez *Rana temporaria* et montrent que les lois de « minimum efficace » et de « seuils différentiels » établies par PÉZARD pour les hormones sexuelles s'appliquent également à l'action morphogénétique de la thyroxine lors de la métamorphose expérimentale des Anoures.

Chaque organe réagit à une dose définie et l'effet ainsi obtenu n'est pas influencé par une concentration plus élevée. Ainsi, chez *Rana temporaria*, les concentrations en thyroxine inférieures à 10^{-8} sont inefficaces. De 10^{-8} à $5 \cdot 10^{-8}$ elles déclenchent uniquement la fonction glycogénique du foie, qui constitue ainsi la manifestation initiale de la métamorphose. De 10^{-7} à $5 \cdot 10^{-7}$ elles provoquent la poussée des pattes postérieures (proportionnellement à la concentration) et les premiers remaniements de l'intestin. Les concentrations comprises entre $5 \cdot 10^{-7}$ et $2 \cdot 10^{-6}$ aboutissent à une métamorphose presque totale, sauf au niveau de la queue qui subsiste. Enfin au-dessus de $2 \cdot 10^{-6}$ ($4 \cdot 10^{-6}$ à $2 \cdot 10^{-5}$ ou plus) la métamorphose est complète, brutale, rapide et dysharmonique.

En même temps qu'elle déclenche la fonction glycogénique du foie, la thyroxine détermine la transformation des îlots pancréatiques primaires de Laguesse, non fonctionnels, en îlots secondaires ou de Langerhans, insulino-sécréteurs, c'est-à-dire la « maturation » insulaire du pancréas qui ne s'opère, dans les conditions normales, qu'au moment de la métamorphose (ARON, 1931). C'est d'ailleurs par l'intermédiaire du relais pancréatique que la thyroxine agit sur le foie en provoquant l'éveil de la fonction glycogénique : la pancréatectomie totale chez *Rana fusca* suivie du traitement par la thyroïde fraîche ou la thyroxine, n'entraîne plus, en effet, l'accumulation du glycogène hépatique. Si le foie contenait déjà du glycogène au moment de la pancréatectomie, cette quantité n'augmente pas comme chez les témoins (ARON, 1931).

Comme je l'ai indiqué dans l'introduction, cette action glycogéno-

formatrice de la thyroxine n'a pu être généralisée aux autres embryons de Vertébrés. ARON lui-même (1933 *b*) n'a pu obtenir un dépôt de glycogène prématuré dans le foie de fœtus de Cobaye, bien que la thyroxine, injectée *in utero*, détermine la même flexion des îlots endocrines du pancréas que chez les Anoures. Chez l'embryon de Poulet, la thyroxine est sans effet sur le glycogène hépatique (GUELIN-SCHEDRINA, 1934) ou bien amène sa disparition rapide (DALTON et HANZAL, 1937, 1940).

On sait enfin que l'action de la thyroxine sur le glycogène hépatique de l'adulte est controversée (voir à ce sujet RAWSON, RAIL et SONENBERG, 1955). Chez les Amphibiens, les seules indications sont données par WARREN (1940) chez *Rana pipiens* et FALES (1949) chez *Triturus viridescens* et correspondent à une chute du glycogène sans action sur le pancréas endocrine (WARREN).

1° MATÉRIEL ET TECHNIQUES

J'ai repris l'étude de l'action de la thyroxine chez les larves de six espèces d'Anoures, en faisant varier à la fois la *concentration* hormonale (10^{-6} à 10^{-8} dans l'eau d'élevage) et le *stade* d'administration.

L'expérimentation a porté sur plus d'un millier de têtards (*Rana temporaria*, *Rana esculenta*, *Bufo bufo*, *Discoglossus pictus*, *Alytes obstetricans*, *Pelodytes punctatus*). Les résultats sont rapportés dans les tableaux XVIII à XXIX.

TABLEAU XVIII

Rana esculenta.

Durée (heures)	Témoins		Thyroxine $5 \cdot 10^{-8}$		Thiourée 0,33 0/00		Glucose 4 0/00	
	Stades		Stades		Stades		Stades	
0	O	3 — 2 tr						
48	I	2 tr 3 +	II	3 — 2 tr	I	5 —	I	1 + 2 ++ 2 +++
72	I	2 — 3 tr	II-III	5 tr	I	5 —	I	5 +++
96	I-II	1 — 2 tr 2 +	III	5 —	II	5 —	II	5 +++
120	II	3 + 1 +++	III	1 + 4 ++	II	5 —	II	5 +++
144	II-III	5 ++	III	5 +++	II-III		II-III	5 +++

TABLEAU XIX
Alytes obstetricans. Thyroxine.

Durée (heures)	Témoins		Thyroxine $2 \cdot 10^{-8}$		Thyroxine $2 \cdot 10^{-7}$	
	Stades		Stades		Stades	
0	O	5 —				
24	O	5 —	O-I	5 —	O-I	5 —
48	I	5 —	I	5 —	I	5 —

TABLEAU XX
Bufo bufo. Thyroxine.

Durée (heures)	Témoins		Thyroxine $5 \cdot 10^{-8}$		Thyroxine 10^{-6}	
	Stades		Stades		Stades	
0	III ₆₋₇	5 +				
48	III ₇₋₈	5 tr	III ₈	3 tr 2 +	III ₇₋₈	3 tr 2 +
72	III ₈₋₉	5 tr	III ₈₋₉	1 tr 4 +	III ₈₋₉	3 tr 2 +
96	III ₁₀	3 tr 2 +	O-II	5 —	III ₁₀	5 —

TABLEAU XXI
Bufo bufo. Thyroxine.

Durée (heures)	Témoins		Thyroxine $2 \cdot 10^{-8}$		Thyroxine $2 \cdot 10^{-7}$		Thyroxine 10^{-6}	
	Stades		Stades		Stades		Stades	
0	III ₈	5 tr						
24	III ₉	5 tr	III ₉	5 tr	III ₉	5 tr	III ₉	5 tr
48	III ₁₀	5 +	III ₉ III ₁₀	5 +	III ₉ III ₁₀	5 +	III ₁₀	5 +
96	O-III	5 —	O-III	2 tr 3 +	O-III	5 +	O-III	5 +
120	O-III	5 —	O-III	5 tr	O-III	1 — 4 tr	O-III	1 — 4 +
144	III	1 + 4 tr	III	3 + 2 ++	III	3 + 2 ++	III	1 + 4 ++

TABLEAU XXII

Bufo bufo. Thyroxine.

Durée (heures)	Témoins		Thyroxine $5 \cdot 10^{-8}$		Thyroxine $2 \cdot 10^{-7}$	
	Stades		Stades		Stades	
0	II-III	3 tr 2 +				
24	III	5 +	III	3 + 2 ++	III	5 +
72	III	2 + 3 ++	III	5 +++	III-IV	5 +++
120	III-IV	5 ++	III-IV	5 +++	IV	5 +++

TABLEAU XXIII

Discoglossus pictus. Thyroxine.

Durée (heures)	Témoins		Thyroxine 10^{-8}		Thyroxine $5 \cdot 10^{-8}$		Thyroxine 10^{-7}		Thyroxine $5 \cdot 10^{-7}$		Thyroxine 10^{-6}	
	Stades		Stades		Stades		Stades		Stades		Stades	
0	26	4 tr 5 +										
24	27	2 tr 3 +	27	5 tr	27	5 tr	29	5 tr	29	5 tr	26	2 tr
48	30-31	2 tr 5 +	30-31	3 tr 2 +	30-31	2 tr 3 +	30-31	2 tr 3 +	31	4 + 1 tr	26	2 tr 3 —
120	I	5 +	I	5 ++	II	3 tr 2 + +	II	2 + 3 +++	II-III	3 ++ 2 +++	26	5 —

TABLEAU XXIV

Discoglossus pictus. Thyroxine.

Durée (heures)	Témoins		Thyroxine $2 \cdot 10^{-8}$		Thyroxine $2 \cdot 10^{-7}$		Thyroxine 10^{-6}	
	Stades		Stades		Stades		Stades	
0	27-28	1 + 4 tr						
48	32	5 —	32	5 tr	32	5 +	32	3 + 2 —
72	I	5 tr	O-I	5 —	O	5 —	I-II	5 —
96	II	2 tr 3 —	II	5 —	II	1 — 4 tr	II	2 — 3 —

TABLEAU XXV

Pelodytes punctatus. Thyroxine.

Durée (heures)	Témoins		Thyroxine $2 \cdot 10^{-9}$		Thyroxine $2 \cdot 10^{-7}$	
	Stades		Stades		Stades	
0	O	5 tr				
24	O-I	3 tr 2 —	O	5 tr	O	5 tr
48	O-I	5 —	II	3 tr 2 —	II	5 tr

TABLEAU XXVI

Rana temporaria. Thyroxine.

Durée (heures)	Témoins		Thyroxine $2 \cdot 10^{-8}$		Thyroxine $2 \cdot 10^{-7}$		Thyroxine 10^{-6}	
	Stades		Stades		Stades		Stades	
0	12-13	2 tr 3 +						
24	13	5 +	14	5 +	13-14	5 +	13-14	5 +
48	15-16	5 +	16	5 +	15	5 +	15-16	5 +
96	16-17	5 +	17	5 +	16-17	5 +	17-18	5 +
120	17-18	5 tr	O-II	2 tr 3 —	II	4 + 1 tr	O-II	5 +
144	17-18	2 tr 3 —	O-II	5 —	II-III	5 tr	O-II	5 tr

TABLEAU XXVII

Rana temporaria. Thyroxine.

Durée (heures)	Témoins		Thyroxine $2 \cdot 10^{-8}$		Thyroxine $2 \cdot 10^{-7}$		Thyroxine 10^{-6}	
	Stades		Stades		Stades		Stades	
0	13	5 +						
48	15	5 +	15	5 +	15	5 +	15	5 —
72	17	1 + 4 tr	17	5 +	17	5 +	17-18	2 + 3 tr
96	17-18	3 tr 2 —	17-18	5 tr	17-18	4 tr 1 +	17-18	5 tr
120	O-II	5 —	O-II	3 — 2 tr	O-II	1 — 4 tr	III	4 tr 1 +
144	II-III	1 — 4 tr	II-III	5 —	III	5 tr	III	1 tr 4 +

TABLEAU XXVIII

Rana temporaria. Thyroxine.

Durée (heures)	Témoins		Thyroxine $5 \cdot 10^{-8}$		Thyroxine 10^{-6}	
	Stades		Stades		Stades	
0	16-17	4 + 1 tr				
48	17-18	2 + 3 tr	17-18	5 tr	17-18	5 —
72	17-18	2 tr 3 —	17-18	3 tr 2 —	17-18	1 tr 4 —
96	O-II	5 —	O-II	5 —	O-II	5 —

TABLEAU XXIX

Rana temporaria. Thyroxine.

Durée (heures)	Témoins		Thyroxine $2 \cdot 10^{-8}$		Thyroxine $2 \cdot 10^{-7}$		Thyroxine 10^{-6}	
	Stades		Stades		Stades		Stades	
0	17	5 +						
24	17-18	2 tr 3 +	17-18	2 tr 3 +	17-18	1 tr 4 +	17-18	5 +
48	O-I	2 tr 3 —	O-I	5 —	O-I	5 tr	I-II	5 +
72	II	5 —	II	3 —	II	5 tr	II-III	2 tr
96	III	5 —	III	5 tr	III	2 — 3 tr	III	1 tr 4 +

2° RÉSULTATS

Il n'est pas question d'indiquer une *règle générale* d'action de la thyroxine en fonction d'une concentration déterminée, d'un stade d'application donné, voire d'une espèce d'Anoure. Les résultats sont très *variables*. Il est cependant possible de les grouper de la façon suivante :

a) Chez les larves *dépourvues* de glycogène hépatique (glycogène embryonnaire disparu, glycogène définitif alimentaire non encore stocké) la thyroxine n'en fait *jamais apparaître* (cf. *Alytes obstetricans*,

tableau XIX : 24 et 48 heures ; *Rana temporaria*, tableau XXVIII : 96 heures ; *Pelodytes punctatus*, tableau XXV : 48 heures).

b) Cependant, chez les larves jeunes une *différence* peut être notée en faveur des traités quand le foie des témoins contient encore du glycogène embryonnaire : *Rana temporaria*, tableau XXIX : 48 heures ; *Bufo bufo*, tableau XX : 48-72 heures.

Cette différence se prolonge même dans les 24 ou 48 heures qui suivent la disparition du glycogène embryonnaire des témoins, comme si celui-ci subsistait plus longtemps chez les traités : *Rana temporaria*, tableau XXIX : 72-96 heures ; tableau XXVII : 96-120 heures ; *Bufo bufo*, tableau XXI : 96-120 heures ; *Pelodytes punctatus*, tableau XXV : 24-48 heures.

Il est cependant des cas où le glycogène embryonnaire disparaît plus vite chez les traités que chez les témoins : *Rana esculenta*, tableau XVIII : 48 heures.

d) Enfin, chez *Rana temporaria*, aux stades où ARON note un dépôt glycogénique abondant (« fin de la période de croissance autotrophique », « phase d'atrophie des houppes branchiales externes »), aucune différence n'est observée entre témoins et traités quelle que soit la dose administrée 24 à 48 heures après le début du traitement (tableaux XXVI-XXVII). A ces stades d'ailleurs, témoins et traités sont encore pourvus de leur glycogène embryonnaire ⁽¹⁾.

En conclusion, il est possible d'affirmer que la thyroxine à des concentrations variées se montre incapable de faire apparaître le glycogène dans le foie des larves d'Anoures. Ce résultat a été confirmé par BELLEC (1957) chez le Pleurodèle ⁽²⁾. Par contre, chez des larves dont le foie contient du glycogène, embryonnaire ou définitif, aucune conclusion d'ensemble ne peut être retenue, ce qui confirme également les résultats divergents obtenus chez les Mammifères adultes.

B. — Insuline.

L'action hypoglycémiante et glycogéno-formatrice de l'insuline chez l'adulte était déjà connue au moment où ARON recherchait le mécanisme de l'apparition du glycogène hépatique chez l'embryon et il est possible

⁽¹⁾ Une augmentation de la teneur en glycogène peut être observée chez les larves ayant commencé à se nourrir et dont le foie contient déjà ou commence à accumuler du glycogène définitif d'origine alimentaire : *Bufo bufo*, tableau XXII : 24, 72 et 120 heures ; *Discoglossus pictus*, tableau XXIII : 120 heures ; *Rana esculenta*, tableau XVIII : 120-144 heures.

Mais dans d'autres cas c'est le résultat inverse qui est noté : les témoins contiennent du glycogène définitif, les traités en sont dépourvus : *Bufo bufo*, tableau XX : 96 heures ; *Discoglossus pictus*, tableau XXIV : 72 et 96 heures.

⁽²⁾ DRAGOIU et FAURÉ-FREMIET (1921 a, b) qui ont étudié cytologiquement et histologiquement la cellule hépatique de têtards de *Rana temporaria* soumis à l'alimentation thyroïdienne signalent la possibilité d'une surcharge graisseuse, mais ne donnent aucune indication quant au glycogène hépatique.

que la découverte récente de l'insuline ait exercé une influence sur la solution de ce problème et sur la théorie hormonale proposée par ARON.

Il est cependant curieux qu'aucune expérience n'ait été tentée par l'auteur de cette théorie pour chercher à obtenir un dépôt prématuré de glycogène à la suite de l'administration d'insuline à l'embryon, alors que des résultats positifs avaient été obtenus par la thyroxine chez le têtard d'Anoure, et qu'ils étaient interprétés comme traduisant une sécrétion insulaire anticipée sous l'influence de l'hormone thyroïdienne.

De tels essais ont été faits postérieurement, surtout chez l'embryon de Poulet (cf. Introduction) et ont, en général, confirmé l'hypothèse de ARON : l'insuline augmente le taux du glycogène hépatique (DALTON et HANZAL, 1937, 1940 ; LEIBSON, 1951 ; RIMNICEANU et coll., 1955) et dans certains cas le fait même apparaître précocement (RIMNICEANU et coll., 1955).

Par contre, chez les Mammifères, l'injection directe au fœtus (SCHLOSSMANN, 1938, PASSMORE et SCHLOSSMANN, 1938) n'exerce aucune influence sur la glycémie et sur le glycogène hépatique fœtal. JOST et JACQUOT (1955) ont montré que l'insuline, seule ou associée avec des corticoïdes est incapable de rétablir la charge normale chez les fœtus de Lapin décapités.

Chez les Amphibiens enfin, il n'existe aucune indication quant à l'action de l'insuline sur le glycogène hépatique des têtards.

1^o MATÉRIEL ET TECHNIQUES

L'insuline a été administrée à des têtards d'*Alytes* par injection spiraculaire de 1/40 et 1/80 d'unité. Cependant chez des animaux de plus petite taille (têtards de *Discoglossus pictus*) l'insuline a été ajoutée à l'eau d'élevage à la concentration de 100 U./litre.

Bien qu'elle soit détruite au niveau de l'intestin, on sait (KROSZCZYNSKI, 1924) que la pénétration au niveau des branchies est suffisante pour provoquer une hypoglycémie marquée chez *Rana temporaria* et *Pelobates fuscus*.

2^o RÉSULTATS

Aucune apparition prématurée n'a pu être obtenue chez *Discoglossus pictus* (tableau XXXI, 90 cas) tandis qu'un très léger dépôt glycogénique inconstant, est noté chez quelques *Alytes obstetricans* (tableau XXX).

C. — Cortisone.

Bien que l'action des hormones cortico-surrénales sur le développement des larves d'Amphibiens ait fait l'objet de quelques investigations, leur retentissement sur le métabolisme glucidique n'a jamais été envisagé.

Les travaux en question se limitent à la participation éventuelle à la métamorphose, directement ou par l'intermédiaire de la thyroïde et les

TABLEAU XXX

Alytes obstetricans. Insuline.

Durée (heures)	Stades	Témoins	Insuline 1/40 unité	Insuline 1/40 unité
0	I	5 —		
24	I	5 —	5 —	1 tr 4 —
48	I-II	5 —	5 —	3 tr 2 —
72	II	5 —	5 —	5 —

TABLEAU XXXI

Discoglossus pictus. Insuline.

Durée (heures)	Stades	Témoins	Insuline 1/40 unité	Insuline 10 unités dans 100 cm ³ d'eau
0	II-III	5 —		
24	III	5 —	5 —	5 —
48	III	5 —	5 —	5 —
72	III	5 —	5 —	5 —

résultats obtenus sont nettement contradictoires. WOITKEWITSCH (1937) (implantation de cortex surrénal de Mammifère), KUUSISTO et TELKKA (1953) (cortisone ajoutée à l'eau d'élevage) chez les Anoures, SLUCZEWSKI et ROTH (1952) (injection de cortisone) chez les Urodèles, n'observent aucune action sur la métamorphose. BOCK (1938) (administration d'extraits corticaux bruts), FRIEDEN et NAILE (1955) (administration de cortisone d'acétate de cortisone et surtout d'hydrocortisone) notent, au contraire, une accélération de la métamorphose provoquée par la thyroxine chez les Anoures. Enfin selon GASCHE (1945) la D. O. C. A. ralentit la métamorphose naturelle du Xénope, alors qu'elle serait sans effet sur *Bufo bufo* et *Rana pipiens* d'après FRIEDEN et NAILE (1955).

Or on sait depuis les recherches fondamentales de INGLE (1940) et LONG et coll. (1940) que les 11 oxycorticostéroïdes (glucocorticoides) jouent — entre autres — un rôle fondamental dans la glyco-régulation, et que leur action se traduit, chez l'animal normal, par une hyperglycémie et un dépôt de glycogène hépatique. Cette dernière propriété est d'ailleurs

si caractéristique que REINECKE et KENDALL (1942) l'ont proposée comme test d'activité de ces hormones.

Ces résultats acquis chez les Mammifères adultes ont été étendus à l'embryon de Poulet (SAMES et LEATHEM, 1952 ; WESTON, 1956) et au fœtus de Rat (ROSS et GOLDSMITH, 1955 ; JACQUOT, 1955, 1956). Dans une note préliminaire (BEAUMONT, 1955) j'ai indiqué qu'ils pouvaient l'être aux larves d'Anoures.

1^o MATÉRIEL ET TECHNIQUES

La cortisone (acétate de cortisone Roussel en solution aqueuse saturée à 17,5 mg. par litre) est administrée soit en *injection* intraspiraculaire (1/40 de cm³) chez les têtards de grosse taille (*Alytes obstetricans*) soit *ajoutée* à l'eau d'élevage de façon à réaliser des solutions de concentration 10^{-6} , 5.10^{-6} ou 10^{-5} (*Rana temporaria*, *Rana esculenta*, *Bufo bufo*, *Discoglossus pictus*).

2^o RÉSULTATS (Tableaux XXXII à XXXVIII)

Chez toutes les espèces d'Anoures étudiées, la cortisone détermine une *apparition précoce* de glycogène hépatique. Mais dans tous les cas ce dépôt n'est *pas durable* malgré la continuation du traitement. Son importance quantitative ainsi que les délais de son installation varient selon les espèces, et dans une même espèce en fonction de la dose administrée.

Les résultats les plus nets sont obtenus chez *Rana esculenta* (tableau XXXVII) 72 à 96 heures après le début du traitement et correspondent à un dépôt particulièrement important qui disparaît complètement 24 heures après son maximum d'intensité. Une action positive très significative est observée chez *Bufo bufo* dans les premières 24 heures (tableaux XXXIV et XXXV), s'atténue et disparaît le lendemain.

Par contre, chez *Rana temporaria*, *Alytes obstetricans* et *Discoglossus pictus* le dépôt glycogénique obtenu avec la cortisone est beaucoup moins net.

La dose de cortisone est-elle trop faible pour permettre un dépôt de glycogène comparable à celui observé chez *Rana esculenta* par exemple ? La question ne peut être résolue en immergeant les têtards dans une solution de concentration supérieure qui se révèle toxique.

Mais plusieurs travaux suggèrent des *relations étroites entre l'acide ascorbique et les hormones corticosurrénales* sur le métabolisme des hydrates de carbone. BANERJEE (1943), MURRAY et MORGAN (1946), NADEL, MULAY et SASLAW (1955) ont montré que la teneur du foie en glycogène est nettement plus faible chez des Cobayes déficients en acide ascorbique que chez des animaux non carencés. En outre, la capacité des glucocorticoïdes à stimuler le dépôt de glycogène hépatique chez des Cobayes qui jeûnent est diminuée chez les animaux carencés (MacKEE, COBBEY et GEIMAN (1949)), augmentée au contraire chez des animaux largement

approvisionnés en acide ascorbique (BACCHUS, HEIFFER et ALTSZULER (1952)). Ces résultats — parmi beaucoup d'autres — montrent donc que l'acide ascorbique renforce l'action glycogénique de la cortisone sur le foie.

J'ai vérifié cet effet de l'acide ascorbique dans le cas de *Rana temporaria* (tableau XXXVIII) et de *Bufo bufo* (tableau XXXIV).

Mais chez l'Alyte et le Discoglosse l'acide ascorbique associé à la cortisone détermine, au contraire, la disparition complète du glycogène qu'avait fait apparaître la cortisone seule. Cette glycogénolyse est probablement due à une dose trop forte des deux produits, comme le montre la comparaison des résultats obtenus chez *Bufo bufo* à partir des 2 concentrations de $5 \cdot 10^{-7}$ (tableau XXXIV) et 10^{-6} (tableau XXXV).

TABLEAU XXXII

Alytes obstetricans. Cortisone.

Durée (heures)	Stades	Témoins	Cortisone 10^{-6}	Cortisone $5 \cdot 10^{-6}$	Cortisone 10^{-5}	Cortisone 10^{-6} + acide ascorbique
0	O	5 —				
24	O	5 —	2 + 3 tr	3 + 2 tr	5 —	5 —
48	O	5 —	1 + 2 tr 2 —	1 tr 4 —	5 —	5 —
72	O-I	5 —	5 —	5 —	5 —	5 —

TABLEAU XXXIII

Alytes obstetricans.

Durée (heures)	Stades	Témoins	Cortisone 10^{-6}	ACTH (Choay) $5 \cdot 10^{-7}$	ACTH (Acthar) $5 \cdot 10^{-7}$
0	O	5 —			
24	O	5 —	2 + 3 tr	5 —	3 + 2 tr
48	O	5 —	5 —	5 —	5 —

TABLEAU XXXIV

Bufo bufo.

Durée (heures)	Témoins		Cortisone 10^{-6}		Cortisone 5.10^{-7} + acide ascorbique		ACTH 5.10^{-7}	
	Stades		Stades		Stades		Stades	
0	III ₁₀	5 —						
48	O-II	1 + 4 tr	O-II	3 ++ 1 + 1 —	O-II	1 +++ 2 ++ 2 +	O-II	1 ++ 2 + 1 tr
72	O-II	5 —	II-III	5 —	II-III	2 + 2 tr 1 —	O-II	1 tr 1 + 3 —

TABLEAU XXXV

Bufo bufo

Durée (heures)	Stades	Témoins	Cortisone 10^{-6}	Cortisone 10^{-6} + acide ascorbique	ACTH 5.10^{-7}
0	III	5 —			
24	III	5 —	1 +++ 2 + 2 —	5 —	1 + 3 tr 1 —
48	III	5 —	1 + 2 tr 2 —	5 —	5 —

TABLEAU XXXVI

Discoglossus pictus.

Durée (heures)	Témoins		Cortisone 5.10^{-6}		ACTH 5.10^{-7}	
	Stades		Stades		Stades	
0	32	5 —				
24	O-I	5 —	O-I	1 — 1 tr 3 +	I	3 — 2 tr
48	I-II	5 —	I-II	2 + 3 tr	II	3 tr 2 —
72	II	5 —	II	1 + 1 tr 3 —	II	1 tr 4 —

TABLEAU XXXVII

Rana esculenta. Cortisone.

Durée (heures)	Témoins		Cortisone 10 ⁻⁶		Cortisone 10 ⁻⁵	
	Stades		Stades		Stades	
0	O	5 —				
48	O	5 —	O-I	2 — 3 +	O	1 tr 4 +
72	O	5 —	O-I	2 ++ 3 +++	O	2 tr 3 +
96	O	5 —	O	5 —	O	2 + 3 +++
144	O-I	5 —	O-I	5 —	O-I	5 —

TABLEAU XXXVIII

Rana temporaria.

Durée (heures)	Témoins		Cortisone 10 ⁻⁶		Cortisone 5.10 ⁻⁷ + acide ascorbique		ACTH 5.10 ⁻⁷	
	Stades		Stades		Stades		Stades	
0	17-18	3 tr 2 —						
24	II	5 —	II	5 —			II	5 —
48	II	2 — 2 tr 1 +	II-III	3 — 1 tr 1 +	II-III	1 — 4 tr	II	2 — 3 tr
72	II	5 —	II-III	2 — 1 tr 2 +	II-III	2 + 3 ++	II-III	3 + 2 tr
96	II	3 — 2 tr	III	5 —	III	5 +	II-III	1 + 4 ++
120	III	5 —	III	5 —	III	2 tr 3 —	III	2 + 1 tr 2 —

3^o CONCLUSION

La cortisone (acétate de cortisone Roussel) seule ou associée à l'acide ascorbique, est susceptible de provoquer une apparition prématurée de glycogène hépatique. Mais cette néoglucogenèse est fugace et quantitativement peu importante. Des résultats comparables ont été obtenus par BELLEC (1958) chez le Pleurodèle. Ils indiquent que si la cortisone peut avoir une influence limitée, sur le métabolisme hydrocarboné des larves d'Amphibiens, elle ne saurait à elle seule, ou pour une large part, conditionner l'installation de la fonction glycogénique.

D. — ACTH.

On sait d'autre part que l'ACTH provoque également un dépôt glycogénique dans le foie des Mammifères adultes (LONG, 1947 ; SAYERS et SAYERS, 1948). Il a été démontré que cette propriété n'est pas due à une action métabolique propre de l'hormone, mais qu'elle s'exerce indirectement par l'intermédiaire du cortex, puisqu'elle ne se manifeste pas chez l'animal surrénalectomisé (LONG, 1937).

1^o MATÉRIEL ET TECHNIQUE

L'ACTH (ACTH Choay lyophilisé ou Acthar Armour lyophilisé) est administré soit en injection intraspiraculaire (1/40 de milligramme en solution physiologique) (*Alytes obstetricans*), soit ajoutée à l'eau d'élevage (renouvelée toutes les 6 heures) à la concentration de 5.10^{-7} (*Rana temporaria*, *Bufo bufo*, *Discoglossus pictus*).

2^o RÉSULTATS (tableaux XXXIII à XXXVI et XXXVIII)

Chez toutes les espèces étudiées, l'ACTH induit un dépôt de glycogène, mais les modalités de cette apparition sont fonction d'un certain temps d'application, de la qualité du produit hormonal et de l'espèce animale.

Les résultats les plus nets sont obtenus chez *Rana temporaria* 96 heures après le début du traitement (tableau XXXVIII).

Une action plus discrète est notée dès les premières 24 heures chez des têtards relativement âgés de *Bufo bufo*, et chez *Alytes obstetricans*. Par contre les têtards plus jeunes de *Bufo bufo* ne répondent à l'administration d'ACTH qu'après un délai de 48 à 72 heures.

Enfin l'action glygéno-formatrice de l'ACTH est peu significative chez le Discoglosse.

Ces différences sont peut-être dues à des différences de « maturité » de l'organe interrénal que ne révèle pas l'histologie.

De toute façon, comme dans le cas de la cortisone, le dépôt de glycogène obtenu avec l'hormone corticotrope est *fugace* et relativement *discret*.

Il est intéressant de rappeler ici que l'ACTH ne provoque pas de néoglucogenèse dans le foie des larves de Pleurodèle aux stades où la cortisone est active (BELLEC, 1958) et où l'organe interrénal du Pleurodèle n'est pas encore différencié (PASTEELS, 1957).

CINQUIÈME PARTIE

CULTURE *IN VITRO* DE FOIE LARVAIRE

On sait depuis HOLMES (GEMMILL et HOLMES, 1935 ; BACH et HOLMES, 1937 ; CROSS et HOLMES, 1937) que des *coupes de foie de Mammifère adulte* (Lapin et Rat) peuvent synthétiser du glycogène *in vitro*, en milieu liquide an hormonal, à partir de substrats variés, glucidiques ou non, ajoutés au milieu.

Ces premiers résultats ont été largement confirmés ultérieurement et la technique de GEMMILL a permis d'apporter une importante contribution au mécanisme de la glycogénèse hépatique et musculaire, tant du point de vue des métabolites glycogénétiques, que de l'action de divers produits hormonaux (insuline, corticoïdes) et des conséquences de certaines interventions sur l'animal (hypophysectomie, diabète, surrénalectomie).

La recherche de la synthèse éventuelle du glycogène par le *foie embryonnaire* n'a jusqu'ici été envisagée qu'en *culture de tissu*. Dès 1924, POLICARD réussit à cultiver des cellules hépatiques de fœtus de Rat du 15^e au 18^e jour de la gestation, mais ne peut mettre en évidence du glycogène par la gomme iodée (¹). A peu près simultanément, DOLJANSKI (1929 *a*, 1929 *b*, 1930, 1931) chez l'embryon de Poulet, et NORDMANN (1930) chez l'embryon de Poulet et le fœtus de Rat montrent que dans certaines conditions, la cellule hépatique peut se charger en glycogène *in vitro*.

Bien que la culture organotypique du foie embryonnaire ait été réalisée chez le Poulet (par WOLFF sur milieu solide) et le Rat (CHEN, 1954, en milieu liquide), la possibilité d'une synthèse glycogénique *in vitro* dans ces conditions n'a pas été recherchée.

Les résultats que j'ai obtenus, et qui viennent d'être rapportés, incitent à penser que l'apparition du glycogène dans le foie des larves d'Anoures peut se faire sans intervention hormonale. Cette hypothèse ne peut être démontrée qu'en obtenant un dépôt glycogénique important dans des conditions rigoureusement an hormonales, c'est-à-dire en culture *in vitro* sur un milieu de composition chimique définie.

(¹) Avant lui, d'autres auteurs ont réussi la culture de tissu hépatique dans les différents groupes de Vertébrés : Sélaciens (DOBROWOLSKY, 1916 ; GARGANO, 1923), Oiseaux (LYNCH, 1921 ; LEVI, 1922 ; LEWIS, 1922), Mammifères (SMIRNOV, 1916 ; AKAMATSU, 1922 ; BIANCHINI et EVANGELISTI, 1922 ; MITSUDA, 1924). Mais la recherche du glycogène dans les cellules en cultures ne semble pas avoir été envisagée.

I. — Mise au point d'une technique de culture in vitro de foie larvaire d'Amphibien.

A. — Milieu de culture.

1^o ESSAIS SUR MILIEUX SOLIDES (*Discoglossus pictus*)

Les premières explantations ont été faites sur le milieu standard de WOLFF (1952 a-1952 b). Une vingtaine de foies ont été explantés à des stades variés (30 à III). 24 heures après ils s'étaient tous à la surface du milieu qui réalise ainsi d'excellentes conditions de culture histiotypique. Les milieux riches en substances nutritives favorisant la culture de tissu, j'ai essayé d'adapter le milieu standard de WOLFF à la culture organotypique de foie larvaire d'Amphibien en diminuant la proportion d'extrait embryonnaire et en modifiant les proportions relatives gélose-Tyrode de façon à changer la consistance. Toutes les combinaisons essayées (une dizaine) n'ont pu éviter la migration et la dissémination cellulaire, rendant ainsi tout prélèvement impossible. Dans le cas particulier, la tendance exagérée à la culture de tissu, manifestée par le foie larvaire n'est pas due uniquement à la valeur nutritive du milieu, mais à son état solide (voir plus loin, p. 367).

2^o MILIEUX LIQUIDES

Après ces échecs, j'ai fait des essais de culture en milieu liquide. Deux milieux s'imposent chez les Amphibiens, celui de Holtfreter (1931) et celui de Niu et Twitty (1953) ⁽¹⁾. Tous deux ont permis la culture organotypique de foie larvaire, soit après adjonction d'extrait embryonnaire de Poulet, soit mieux, sans extrait, c'est-à-dire sur milieu synthétique.

B. — Le support.

L'un des principes essentiels de la culture d'organes consiste, selon WOLFF (1952 a), en une large aération de l'explant. Cette condition est réalisée d'emblée (moyennant certaines précautions) sur milieu solide. Par contre, en milieu liquide, l'explant, plus dense, tombe au fond du récipient de culture où les conditions sont celles de l'anaérobiose.

Pour pallier cet inconvénient, CHEN (1954) utilise des sortes de petits radeaux de papier de soie flottant à la surface du milieu et sur lesquels il dépose avec précaution les explants provenant d'embryons de Mammifères.

J'ai adopté cette technique en la modifiant très légèrement : les radeaux sont constitués par des carrés de papier Joseph de 1 centimètre de côté, préalablement dégraissés à l'éther (2 bains de 1 heure), lavés à l'alcool absolu (2 bains de 1 heure) puis longuement rincés à l'eau bidistillée (4 bains de 3 heures) séchés à l'étuve et stérilisés.

C. — La stérilisation des larves.

Ce problème est fondamental dans la culture de tissus ou d'organes d'Amphibiens, les embryons et les larves étant naturellement contaminés par la flore bactérienne de l'eau d'élevage.

⁽¹⁾ Une modification du liquide de Niu et Twitty m'a été indiquée par M. DEVI-
LERS. Elle diffère, en particulier, de la formule classique par l'absence d'ions Ca et Mg.
Elle s'est révélée impropre à la culture organotypique du foie des espèces que j'ai
étudiées, probablement à cause de sa composition ionique (cf. p. 376).

Les embryologistes lui ont apporté différentes solutions, mais toutes nécessitent l'immersion prolongée (24 heures) dans un liquide faiblement antiseptique, sans action sur les tissus superficiels : sulfadiazine de Na à 0,5 0/0 (DETWILER et coll., 1947), sulfadiazine de Na à 0,5 0/0 + streptomycine (WILDE, 1948), Tyrode dilué + pénicilline (PRESTON, 1949), etc.

Ce délai de 24 heures constitue un inconvénient certain quand il s'agit de prélever un organe à un stade précis du développement chez une espèce à développement rapide comme le Discoglosse. Le méthosulfate de méthylphényl-dodécyl-triméthylammonium commercialisé par Geigy sous le nom de Désogène est, en solution à 0,5 0/0, un antiseptique puissant, à action rapide, couramment utilisé en médecine opératoire. Mais son action prolongée, au-delà de 2 minutes, irrite rapidement et irréversiblement l'épiderme fragile des embryons et jeunes larves d'Amphibiens. Cet inconvénient est cependant mineur, en ce qui nous concerne, d'autant plus qu'une immersion d'environ 1 minute à 1 minute et demie, suffit à rendre l'embryon aseptique. En même temps il détermine une anesthésie partielle, suffisante pour le prélèvement de l'explant.

D. — La technique.

1° Les embryons ou jeunes larves sont immergés dans 2 bains successifs de Désogène à 0,5 0/0 dans l'eau, de 30 secondes chacun.

2° Le Désogène est éliminé par rinçage dans le liquide de culture (2 bains de 1 minute). Le passage d'un bain au suivant se fait avec des compte-gouttes stériles dans lesquels les animaux sont aspirés.

3° Les têtards sont ensuite retirés du 2^e bain de milieu de culture (dans lequel ils peuvent éventuellement séjourner quelques minutes avant d'être utilisés) et transportés avec quelques gouttes de liquide sur un godet de paraffine (préalablement flambé à l'alcool) où se fera le prélèvement.

4° Celui-ci a lieu sous le binoculaire. Le têtard est rapidement ouvert, le foie prélevé en totalité, sans lésions, avec sa vésicule biliaire, en évitant de perforer l'intestin (non aseptique chez les animaux qui ont commencé à s'alimenter). Il est transporté dans une cuiller à transplantation et déposé avec précaution sur le radeau de papier Joseph qui flotte à la surface du liquide de culture. Celui-ci est contenu dans une « salière » à demi remplie (1,5 à 2 cm³). Les salières sont couvertes avec une plaque de verre non lutée et laissées dans la cabine de culture.

5° Les explants sont prélevés au bout de 24 heures, fixés au liquide de Gendre et inclus à la paraffine selon la technique habituelle. Ils sont manipulés avec des pipettes fines pour éviter l'inclusion à la gélose.

II. — Résultats.

1° CULTURES SUR UN MILIEU MINÉRAL ENRICHI AVEC DE L'EXTRAIT D'EMBRYON DE POULET (tableau XXXIX)

Une première série d'explantations a été réalisée dans les liquides de Holtfreter ou de Niu et Twitty auxquels on ajoute — par centimètre cube — 1 à 2 gouttes d'extrait embryonnaire de Poulet préparé selon la technique de WOLFF à partir d'embryons au 8^e jour de l'incubation. Elle porte uniquement sur les foies de Discoglosse prélevés à des stades variés : stade 24 de GALLIEN et HOUILLON à stade III de TAYLOR et KOLLOSS.

TABLEAU XXXIX

Cultures sur milieu minéral + extrait d'embryon de Poulet de 8 jours.
Discoglossus pictus.

Stades de culture	Témoins	Niu et Twitty	Niu et Twitty + glucose à 1 0/00	Holtfreter + glucose à 1 0/00	Niu et Twitty + glucose à 0,25 0/00	Niu et Twitty + glucose à 0,1 0/00
24	tr					
25	+	2 — 1 tr	5 +++		1 —	1 tr
27	tr				1 +	
28	tr			1 ++		
31	—	2 ++	1 +++ 1 +	2 ++		
II	+		2 +++	1 ++		
III	+		2 +++			

Deux milieux sont utilisés, l'un sans glucose, l'autre glucosé à 1, 0,25 ou 0,1 0/00.

Tous les explants manifestent une *activité prolifératrice* importante qui les entoure d'une *auréole* de cellules en culture histiotypique. La richesse de ces milieux en produits nutritifs explique certainement le mauvais état des explantations. Cette auréole de cellules migratrices est particulièrement développée sur le milieu non glucosé. Elle « asphyxie » les cellules restées en place du noyau central, et, celui-ci qui subsiste seul au moment de la confection des coupes montre les signes histologiques d'une mauvaise culture. Le glycogène « embryonnaire » que tous les explants contenaient au moment du prélèvement est rare ou absent, ce qui témoigne d'une glycolyse plus ou moins prononcée.

En milieu glucosé par contre, la tendance à l'essaimage cellulaire est d'autant moins forte que le milieu est plus riche en glucose : avec 1 0/00 de glucose, la qualité des explants est meilleure et le dépôt glycogénique important à tous les stades étudiés.

2° CULTURES SUR MILIEUX SANS EXTRAIT EMBRYONNAIRE (MILIEUX SYNTHÉTIQUES)

Cette première série de résultats montre que le foie des jeunes larves de *Discoglosse* peut *synthétiser du glycogène in vitro*, à partir de glucose ou d'autres substances (extrait embryonnaire) dans un *milieu en principe anhormonal*. Cependant on sait actuellement, que certaines glandes endocrines de l'embryon de Poulet (hypophyse, thyroïde en particulier) peuvent déjà excréter de faibles quantités d'hormones avant le 8^e jour de l'incubation (TIXIER-VIDAL, 1958).

TABLEAU XL
Cultures sur milieu minéral sans substrat organique.

Niu et Twitty			Holtfreter					
<i>Discoglossus pictus</i>			<i>Bufo bufo</i>			<i>Rana temporaria</i>		
Stades	Témoins		Stades	Témoins		Stades	Témoins	
24	tr	1 +	III ₇	+	4 tr	17	tr	3 —
26	+	1 tr						
27	tr	4 tr						
29	tr	1 tr	III ₈	+	1 —			
30	tr	2 tr						
30-31	tr	2 tr	III ₉	tr	1 —	17-18	tr	6 —
31	—	1 +						
32	—	11 —						
II	+	2 —	III		1 —	III	—	4 —
III	++							

Ceci m'a amené à supprimer l'extrait embryonnaire et à réaliser les explantations sur *milieu synthétique, rigoureusement an hormonal*. Cette condition se révèle d'ailleurs favorable en ce sens que sur de tels milieux, moins riches en substances nutritives, la tendance à la culture histiotypique disparaît ⁽¹⁾ et les conditions d'une culture organotypique semblent parfaitement réalisées ⁽²⁾.

L'exploration de la glycogénèse *in vitro* a pu ainsi être entreprise.

a) Des explantations de foie ont été faites à partir de larves appartenant à diverses espèces d'Anoures, sur milieu minéral synthétique *sans substrat organique*. L'action de la thyroxine, de la cortisone et de l'insuline sur les explants prélevés *avant* la disparition du glycogène embryonnaire, a été étudiée.

b) L'obtention d'un dépôt de glycogène a été recherchée chez les mêmes espèces à partir de *substrats variés*, glucidiques ou non.

c) L'influence des *hormones* précédemment citées sur la glycogénèse obtenue en b) a enfin été envisagée.

1. — Milieux minéraux sans substrat organique (tableaux XL et XLVII à L).

Les résultats obtenus chez les Mammifères adultes à partir de coupes de foie de Rat et de Lapin agitées dans du Ringer à 37° sans substrat

⁽¹⁾ Cependant cette tendance se manifeste dès que certaines conditions de tension superficielle sont réalisées, en particulier quand le support de papier Joseph n'est pas suffisamment mouillé par le liquide de culture.

⁽²⁾ Les milieux minéraux synthétiques utilisés pour la culture de foie larvaire d'Anoure conviennent également aux Urodèles (BELLEC, 1957).

organique sont nettement contradictoires. Tandis que GEMMILL et HOLMES (1935), BACH et HOLMES (1937), CROSS et HOLMES (1937), STADIE, LUKENS et ZAPP (1940), KÖEPF, HORN, GEMMILL et THORN (1941) obtiennent une *glycogenèse* importante dans ces conditions, SECKEL (1938 a, 1938 b, 1940) CHIU et NEEDHAM (1948, 1950), CHIU (1950) notent au contraire une *glycolyse* importante et rapide. La différence tient peut-être au fait que les premiers auteurs cités utilisent des coupes de foie provenant d'animaux venant d'être nourris, alors que les seconds s'adressent à des animaux à jeun depuis 24 heures.

Toutes les explantations indiquées dans le tableau XL ont été faites à partir de larves en fin de croissance autotrophique, c'est-à-dire qui ne se sont pas encore alimentées, ou de larves plus âgées mais maintenues à jeun.

Elles manifestent une *glycolyse* intense et immédiate (*Rana temporaria*, *Bufo bufo*) ou plus discrète (*Discoglossus pictus*) qui se traduit par la diminution ou la disparition plus rapides du glycogène « embryonnaire » que chez les témoins.

La *thyroxine*, la *cortisone* et l'*insuline* ajoutées au milieu synthétique sans substrat n'inhibent pas la glycogénolyse qui se produit normalement, puisqu'aucun des explants (sauf un) ne contient de glycogène. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus par SECKEL (1938 b) avec l'insuline, SECKEL (1940), CHIU et NEEDHAM (1948, 1950), CHIU (1950) avec les corticoïdes : ces hormones réduisent plus ou moins intensément la glycogénolyse hépatique des coupes de foie de Rat et de Lapin adulte *in vitro*.

2. — Substrat = glucose (tableaux XLI à XLIV et planche XX).

154 explantations ont été effectuées sur milieu synthétique glucosé à 1, 0,25, 0,1, 0,02 et 0,01 0/00.

Dans l'ensemble le foie larvaire de toutes les espèces d'Anoures étudiées synthétise du glycogène *in vitro* à partir de glucose. Mais l'importance de cette glycogenèse est très variable suivant les espèces, et chez une même espèce, selon la concentration du milieu en glucose.

a) *Discoglossus pictus* est, de loin, l'espèce la plus favorable à cette démonstration, quel que soit le stade étudié, surtout avec des concentrations de glucose de 1 et 0,1 0/00. Dans ces conditions, les cultures montrent :

— que le glycogène peut apparaître *in vitro* aux stades où le foie des témoins n'en contient aucune trace (le glycogène « embryonnaire » étant disparu et le glycogène définitif non encore apparu) ;

— que la quantité de glycogène ainsi synthétisée est au moins égale, et très souvent supérieure, comparée histochimiquement, à celle de larves nourries normalement (il ne s'agit donc pas d'un dépôt accessoire et fugace) ;

TABLEAU XLII

Substrat = Glucose à 1 0/00.

<i>Discoglossus pictus</i>			<i>Bufo bufo</i>			<i>Rana temporaria</i>			<i>Alytes obstetricans</i>		
Stades	Tém.	Cult.	Stades	Tém.	Cult.	Stades	Tém.	Cult.	Stades	Tém.	Cult.
25	tr	2 ++	III ₇	+	2 tr 2 ++						
26	+	1 + 1 ++									
27	tr	1 + 1 ++									
28	tr	1 +++	III ₈	tr	1 ++ 1 —	16	tr	2 —			
			III ₉	tr	1 — 1 ++	17	tr	1 —			
			III ₁₀	—	2 —	17-18	—	9 — 2 tr			
								2 tr			
						I-II	—	1 ++	0	—	2 +
			II-III	—	4 —	II-III	—	2 —			
			III	—	4 tr	III	—	3 — 2 tr			

TABLEAU XLIII

Glucose 0,25 0/00.

<i>Discoglossus pictus</i>			<i>Bufo bufo</i>			<i>Rana temporaria</i>		
Stades	Témoins	Cult.	Stades	Témoins	Cult.	Stades	Témoins	Cult.
25 27	tr +	2 tr 2 +	III ₈	tr	2 +	17	tr	2 — 2 tr
			III ₁₀	—	2 ++	0	—	2 —

TABLEAU XLIV

Discoglossus pictus.

Stades	Témoins	Glucose 0,02 0/00	Glucose 0,01 0/00
27 30,5 31	tr — —	3 tr 3 + 2 —	1 + 3 + 2 —

— que le *foie jeune*, dont les cellules sont encore encombrées de plaquettes vitellines et pourvues de glycogène embryonnaire (stades 24 à 30) s'enrichit de la même façon et aussi nettement qu'aux stades plus âgés.

J'ai montré précédemment, d'une part, que chez le Discoglosse, l'apparition du glycogène hépatique dans de bonnes conditions d'élevage était précoce (stade 0), d'autre part que chez des larves élevées dans diverses solutions glucidiques (glucose, amidon...) cette apparition pouvait être encore plus précoce (stade 30-31). Les résultats des cultures *in vitro* sur milieu glucosé permettent un stockage massif dès le stade 24 (le plus jeune qui ait été expérimenté). Ceci démontre donc que le pouvoir de synthèse du glycogène est une propriété de la cellule hépatique qui se manifeste très tôt au cours de l'ontogenèse, et qui n'a besoin pour se manifester d'aucune stimulation externe, hormonale, par exemple.

Les résultats obtenus avec des concentrations en glucose de 0,25, 0,02 et 0,01 0/00 sont moins démonstratifs. Cependant une synthèse notable a été observée sur milieu glucosé à 0,01 0/00, ce qui témoigne d'un seuil de sensibilité particulièrement faible.

b) Le foie de l'Alyte accumule également des quantités importantes de glycogène à partir de glucose dès l'éclosion (les stades antérieurs n'ont pu être étudiés). La quantité accumulée, comparée à celle présente dans le foie de têtards normaux, correspond à une charge importante, au moins égale à celle réalisée chez des têtards en pleine croissance (stades VII-VIII).

c) Le foie de *Bufo bufo* donne des résultats assez irréguliers ; certains explants sont très nettement positifs, d'autres ne montrent, au contraire, aucune synthèse. Dans certains cas, même, une glycolyse totale du glycogène préexistant est observée. Cependant, les résultats positifs indiquent, comme chez le Discoglosse une synthèse possible à des stades très jeunes (III₇).

d) Les résultats obtenus à partir de *Rana temporaria* sont encore plus inconstants. Une faible synthèse est notée sur milieu glucosé à 1 et 0,25 0/00. Sauf cas exceptionnels, cette synthèse est nulle (il y a même disparition du glycogène « embryonnaire ») sur milieu glucosé à 0,1 0/00. Il faut peut-être rechercher la cause de ces insuccès dans la composition ionique du milieu, inadaptée à la culture du foie de *Rana temporaria* (voir plus loin).

e) Enfin, des essais peu nombreux ont été tentés avec succès chez quelques autres espèces, pour lesquelles je n'ai pu disposer que d'un nombre réduit de têtards (*Xenopus laevis*, *Bombina variegata*, *Mantella aurantiaca*).

3. — Substrat = lévulose, galactose (tableau XLV).

a) Le lévulose à 0,1 0/00 permet un dépôt important de glycogène *in vitro* chez le Discoglosse dès le stade 26 (le premier étudié). Bien que le nombre des explantations soit beaucoup plus faible que dans le cas du

glucose, il ne semble pas y avoir de différence majeure entre les 2 séries expérimentales.

Chez *Rana temporaria*, par contre, la synthèse est pratiquement nulle comme avec le glucose (sauf au stade O).

b) Le *galactose* à 1 0/00 permet dans quelques cas une synthèse glyco-génique dans le foie du Discoglosse.

4. — *Substrat = lactate, pyruvate ou acétate*
(tableau XLV, planche XX, fig. 53).

Le *pyruvate*, tout au moins chez le Discoglosse, est un excellent substrat à partir duquel est réalisée une charge hépatique importante *in vitro*, souvent supérieure à celle obtenue avec le glucose. Il en est de même chez le Pleurodèle (BELLEC, 1957). Ces résultats confirment ceux obtenus par BACH et HOLMES (1937), CROSS et HOLMES (1937), KOEPF, HORN, GEMMILL et THORN (1941), DEANE (1947), BUCHANAN, HASTINGS et NESBETT (1949) chez le Lapin et le Rat adultes.

Le *lactate* est également glycogénétique chez le Discoglosse, mais l'*acétate* donne des résultats non significatifs. CROSS et HOLMES (1937) chez le Lapin n'ont pas obtenu de synthèse.

TABLEAU XLV

<i>Discoglossus pictus</i>							<i>Rana temporaria</i>			
Stades	Témoins	Acétate 1 0/00	Lactate 1 0/00	Pyruvate 1 0/00	Galactose 1 0/00	Lévulose 0,1 0/00	Lévulose 0,1 0/00	Témoins	Stades	
26	tr									
27	+	2 tr 2 +	2 — 2 +		2 +	2 ++ 2 ++				
30	tr			3 +++	1 ++ 2 +		2 tr	tr	17	
31	—	4 tr		4 +++	1 tr		2 tr	tr	17-18	
32	—					3 ++				
O							1 — 3 +	— —	O III	

5. — *Substrat = acides aminés* (tableau XLVI).

Divers acides aminés sont glucogénétiques, *in vitro*, pour le foie des Mammifères adultes : alanine chez le Rat (BACH et HOLMES, 1937), le Lapin (CROSS et HOLMES, 1937), le Chat (STADIE, LUKENS, ZAPP, 1940); acide aspartique, acide glutamique, arginine (BACH et HOLMES, 1937) chez le Rat.

La culture de foie larvaire d'Amphibien sur un milieu contenant un ou plusieurs acides aminés, se fait mal, qu'il s'agisse d'Urodèles (BELLEC,

1957) ou d'Anoures. Quelques explants meurent, beaucoup végètent et ne sont pas utilisables.

Aucune synthèse de glycogène n'a pu être obtenue chez *Rana temporaria* (16 cultures) à partir d'alanine ou de cystéine. Un dépôt faible, mais inconstant est noté, par contre, avec le glyocolle.

TABLEAU XLVI
Acides aminés.

	Stades	Témoins	Glyocolle 1 0/00	Alanine 1 0/00	Cystéine 1 0/00	Mélange des trois + cortisone
<i>Bufo bufo</i>	III ₈	tr	3 ++	3 +		
	III ₉	—	2 ++	2 tr		
	III ₁₀	tr			2 tr	
	O	—				
	III	—	2 —	2 tr	2 —	4 —
<i>Rana tempo- raria</i>	17	tr	2 —	2 —		
		tr	1 —			
			1 tr			
		tr	2 —	2 —	2 —	
		—	2 tr			
			2 —	2 —		4 —

J'ai pu obtenir (postérieurement à ma publication de 1957) un dépôt très net et très important de glycogène à partir de glyocolle chez *Bufo bufo* aux stades 30 et 33, alors que les résultats à partir de l'alanine et de la cystéine sont beaucoup moins nets.

6. — *Actions hormonales in vitro*
(tableaux XLVII à L, planche XX, fig. 55 et 56).

a) *Thyroxine*. — *In vitro*, comme *in vivo*, le rôle de l'hormone thyroïdienne dans la glycogénèse hépatique paraît négligeable.

Sans substrat, la thyroxine n'inhibe pas la glycogénolyse qui a lieu normalement en son absence (voir tableaux XLVII à XLIX).

Associée au glucose, le dépôt glycogénique qu'elle détermine n'est pas significativement différent de celui obtenu avec le glucose seul.

b) *Cortisone*. — SECKEL (1940), CHIU et NEEDHAM (1948, 1950) ont montré que les extraits corticaux totaux (« Eschatin ») diminuent la glycogénolyse qui s'établit dans des coupes de foie de Mammifère adulte sur milieu minéral. Ces résultats ont été confirmés par CHIU et NEEDHAM, 1950, CHIU, 1950 qui ont montré, en outre, que dans les cas où il y a glycogénèse (par exemple à partir de glucose) celle-ci est augmentée en présence de cortisone.

TABLEAU XLVII
Bufo bufo. Thyroxine.

Stades	Témoins	Thyroxine 10 ⁻⁷	Thyroxine 10 ⁻⁷ + glucose à 1 0/00	Thyroxine 10 ⁻⁷ + glucose à 0,25 0/00	Thyroxine 10 ⁻⁷ + glucose à 0,1 0/00
III ₇	tr				2 +
III ₈	tr			1 +	2 ++
III ₉	tr				3 ++
III ₁₀	—	2 —		2 ++	1 ++
O	—	2 —	2 ++	2 ++	1 —
III	—	2 —	2 ++		1 —
					2 tr
					2 ++

TABLEAU XLVIII
Discoglossus pictus.

Stades	Témoins	Thyroxine	Thyroxine 10 ⁻⁷ + glucose à 1 0/00	Thyroxine 10 ⁻⁷ + levulose à 0,1 0/00	Cortisone 10 ⁻⁷ + glucose à 1 0/00	Insuline + glucose à 1 0/00
27	tr		4 +++	3 ++		
32	—	6 —	2 +++	3 ++	3 ++	3 ++
O	tr	1 tr	2 tr		3 ++	1 +
II	tr	2 —	1 +++	2 +++	2 + 1 ++	2 ++ 3 +

TABLEAU XLIX
Rana temporaria.

Thyroxine					Cortisone		
Stades	Témoins	Thyroxine 10 ⁻⁷	Thyroxine 10 ⁻⁷ + glucose à 0,25 0/00	Thyroxine 10 ⁻⁷ + glucose à 0,1 0/00	Cortisone 10 ⁻⁷	Cortisone 10 ⁻⁷ + glucose à 0,1 0/00	Cortisone + acide ascorbique + glucose à 0,1 0/00
15	+						
16	+						
17	tr	1 —				1 — 3 —	4 —
		1 — 1 —	1 +	2 ++ 3 —		2 tr (*) 1 tr (*)	
O	—		1 +	2 —	2 —	1 — 2 — 1 tr (*)	1 —
I-II	—			4 —		1 + (*)	
III	—	1 —		2 —	1 —	4 — 4 —	2 — 3 —

(*) Animaux soumis pendant 2 semaines avant le prélèvement à une température de 4° C.

TABLEAU L
Bufo bufo. Cortisone.

Stades	Témoins	Cortisone 10 ⁻⁷	Cortisone 10 ⁻⁷ + glucose à 1 0/00	Cortisone 10 ⁻⁷ + glucose à 0,1 0/00	Cortisone 10 ⁻⁷ + Ac. ascorbique + glucose à 0,1 0/00
III ₈	tr			1 — 2 + (*)	3 —
III ₁₁	tr	3 —		3 ++ (*) 4 ++ (*) 1 —	
III	—		3 ++	2 ++ (*) 6 tr 2 ++ (*)	4 —

(*) Animaux soumis pendant 3 semaines avant le prélèvement à une température de 4° C.

Je n'ai pas étudié systématiquement l'action de la cortisone *in vitro* sans substrat sur le foie larvaire d'Anoure, mais les explantations qui ont été examinées témoignent d'une glycolyse totale, comme les explants cultivés en l'absence d'hormone (tableaux XLVIII à L).

Sur milieu glucosé, la cortisone ne favorise vraiment la glycogénèse que dans le cas d'explantations faites à partir de larves jeunes, préalablement soumises à l'action du froid (à l'obscurité) et chez lesquelles une hypertrophie de l'organe interrénal a été observée. Dans tous les autres cas, le dépôt de glycogène est comparable, voire inférieur à celui observé sans cortisone.

La glycogénèse *in vitro* à partir d'alanine est possible chez *Bufo bufo*. Elle est inhibée en présence de cortisone.

L'acide ascorbique associé à la cortisone provoque une forte glyco-génolyse du glycogène « embryonnaire » et ne permet aucune synthèse à partir du glucose.

c) *Insuline*. — L'action hépatique de l'insuline *in vitro* est très controversée. Tandis que DE DUVE et coll. (DE DUVE, 1956 ; BERTHET et JACQUES, 1954-1955) obtiennent une activation marquée (40 0/0) de la synthèse *in vitro* du glycogène à partir de glucose marqué sur des coupes de foie de Lapin, OSTERN, HERBERT et HOLMES (1939), BACH et HOLMES (1937) constatent une diminution de la glycogénèse et STADIE, LUCKENS et ZAPP (1940), BENDALL et LEHMANN (1942) n'observent aucune différence.

Les résultats obtenus chez les Anoures (tableau XLVIII) en présence de glucose avec ou sans insuline ne sont pratiquement pas différents.

III. — *Discussion et interprétation.*

a) L'étude *in vitro* de la synthèse éventuelle d'une substance chimique, mise en évidence par son accumulation dans le cytoplasme d'une cellule ou d'une catégorie de cellules pose un problème de perméabilité cellulaire.

Il est bien évident, en effet, que 3 conditions au moins doivent être remplies simultanément pour permettre cette synthèse. Il faut : 1° que la cellule possède l'*équipement enzymatique* correspondant à cette synthèse ; 2° qu'elle dispose de *métabolites* susceptibles d'assurer cette synthèse et 3° enfin que sa membrane soit *perméable* à ces métabolites.

Si l'on admet que les substances chimiques susceptibles d'assurer la glycogénèse chez l'adulte le sont également chez l'embryon ⁽¹⁾, les résultats négatifs obtenus en présence d'un de ces métabolites devront être interprétés en fonction de 2 possibilités. Ou bien la cellule ne peut effectuer la synthèse en question parce qu'elle en est incapable énergétiquement parlant, par exemple à cause d'un équipement enzymatique inadapté, ou incomplet (cas d'une cellule embryonnaire qui n'a pas subi une « maturation » suffisante), ou bien elle ne le peut pas parce que sa membrane est imperméable à tel métabolite (tel autre métabolite, au contraire, permettant cette synthèse).

Or, on sait que la perméabilité cellulaire pour une substance donnée est fortement influencée par la *composition ionique* du milieu, et qu'un certain équilibre est nécessaire pour assurer une perméabilité normale (cf. les expériences classiques de HÖBER sur la perméabilité des hématies et de LOEB sur celle de l'œuf de *Fundulus*).

On conçoit donc l'importance de ce problème en culture *in vitro* sur milieu synthétique minéral, en ce qui concerne la *pénétration cellulaire* des divers substrats organiques étudiés. Il a été soulevé dès 1939 par OSTERN, HERBERT et HOLMES à propos de coupes de foie adulte. Le foie de *Lapin* synthétise du glycogène à partir de glucose dans du Ringer modifié, à tampon bicarbonate. Mais si celui-ci est remplacé par un tampon phosphate, la synthèse est diminuée. Cette diminution s'atténue en présence d'ions Ca^{++} . Enfin l'addition d'ions Ca^{++} au premier milieu permet une synthèse maximum pour une concentration en ions Ca^{++} à peu près équivalente à celle du plasma. DEANE, NESBETT, BUCHANAN, HASTINGS (1947) précisent, en outre, que la synthèse du glycogène à partir de glucose ou de pyruvate est supérieure en présence d'ions Na^+ et K^+ à ce qu'elle est avec les ions Na^+ seuls. BUCHANAN, HASTINGS, NESBETT (1949 *b*) enfin, indiquent la composition d'un milieu minéral qui permet la glycogénèse maximum de coupes de foie de Lapin à partir de pyruvate.

Chez le *Rat*, par contre, HASTINGS et BUCHANAN (1942), DEANE, NESBETT, BUCHANAN, HASTINGS (1947), BUCHANAN, HASTINGS, NESBETT (1949 *a*) montrent que la synthèse de glycogène à partir de glucose est plus intense en présence de K^+ qu'en présence de Na^+ ; que les ions divalents Ca^{++} et Mg^{++} l'augmentent, Ca^{++} étant plus efficace que Mg^{++} ; qu'au contraire Na^+ favorise la glycogénolyse du glycogène préformé. Ils indiquent la composition du milieu qui permet une synthèse maximum de glycogène à partir de glucose, composition différente de celle qui convient pour le Lapin.

⁽¹⁾ Ce qui paraît confirmé, du moins si l'on compare la glycogénèse du foie de Mammifère adulte et celle du foie larvaire d'Amphibien.

TUERKISCHER et WERTHEIMER (1948), comparant la glycogénèse de coupes de foie et de fragments de diaphragme de Rat, constatent que, si K^+ est bien nécessaire à la glycogénèse hépatique, il inhibe la glycogénèse musculaire à concentration physiologique et provoque même la glycogénolyse à plus forte concentration. Cependant si le plasma est utilisé comme milieu incubateur, la synthèse du glycogène par le diaphragme du Rat est possible et de même ordre de grandeur que celle obtenue sur milieu sans K^+ , bien que la concentration du plasma en K^+ soit la même que celle de la solution dans laquelle la glycogénèse est inhibée.

b) On sait, d'autre part, que la présence de certains métabolites (tels que le glucose) dans un milieu synthétique, peut déterminer une *modification des mouvements ioniques* (principalement du K) entre les cellules et le milieu, capable de modifier les processus biochimiques qui se déroulent normalement dans la cellule *in vivo*, malgré la pénétration de ces métabolites (STOLKOWSKI et REINBERG, 1956), et s'opposer ainsi à certains mécanismes de synthèse.

c) La question est donc extrêmement *complexe* et la conclusion que l'on en doit tirer est une interprétation prudente des résultats négatifs concernant la pénétration de telle substance dans une cellule *in vitro*, et, partant, la synthèse de tel produit figuré à partir de cette substance. Les liquides de Holtfreter et de Niu et Twitty permettent chez le Discoglosse un dépôt glycogénique très important en présence de divers substrats. Chez le Pleurodèle par contre, le liquide de Niu et Twitty est plus favorable à la démonstration de la synthèse glycogénique que celui de Holtfreter (BELLEC, 1957). Il en est de même chez *Bufo bufo*. Par contre le liquide de Niu et Twitty modifié sans Ca^{++} ni Mg^{++} ne m'a jamais permis d'obtenir un quelconque dépôt chez les Anoures précédemment cités. Il est probable que l'absence d'ions Ca^{++} , en particulier, est responsable — en partie tout au moins — de cet insuccès systématique (cf. OSTERN, HERBERT et HOLMES, 1939). Il est enfin possible que les résultats positifs très rares obtenus avec *Rana temporaria* soient dus à un milieu minéral non approprié à la culture *in vitro* du foie de cette espèce (cf. les différences de milieu permettant la glycogénèse chez le Rat et le Lapin).

IV. — Conclusion.

Le foie des larves d'Amphibiens étudiés accumule du glycogène en milieu synthétique à partir de glucose, de lévulose, de certains produits intermédiaires du métabolisme glucidique et éventuellement de certains acides aminés.

Cette synthèse est particulièrement importante chez le Discoglosse (qui constitue l'animal de choix pour cette démonstration) et elle peut être mise en évidence dès les plus jeunes stades étudiés (stade 24). Elle est donc possible avant qu'elle ne se manifeste in vivo, probablement parce

que l'apparition *in vivo* du glycogène hépatique est limitée dans le temps par le début de fonctionnement du tube digestif et l'alimentation de la larve.

Ces résultats *confirment* ceux obtenus chez l'adulte par la technique des coupes de foie de Mammifères de GEMMILL, en ce qui concerne la possibilité de glycogénèse *in vitro*, sur milieu minéral. Ils montrent, en outre, que l'installation de cette propriété chez l'embryon d'Amphibien ne nécessite pas non plus un stimulus hormonal ou nerveux.

CONCLUSION

Ainsi que l'ont déjà fait constater JOST et JACQUOT (1955) l'apparition du glycogène dans le foie des embryons de Vertébrés peut donner lieu à deux interprétations très différentes.

1° On peut supposer que le dépôt du glycogène correspond à l'acquisition d'une propriété nouvelle de la cellule hépatique, qui se manifeste sans aucune intervention externe. Elle apparaît en quelque sorte automatiquement, à la suite d'une différenciation fonctionnelle de la cellule, d'une « maturation » au sens physiologique qui se réalise à un stade fixe du développement. Les biochimistes qui proposent cette interprétation (NEMETH, 1954) pensent que l'absence de glycogène avant ce stade est due à une certaine déficience de l'équipement et de l'activité enzymatiques de la cellule hépatique.

2° Au contraire certains endocrinologistes (ARON, 1931) considèrent que l'apparition du glycogène est subordonnée à l'entrée en activité de certaines glandes endocrines embryonnaires dont la différenciation histologique est suivie du début de leur sécrétion hormonale, laquelle aboutit par une série d'interactions en chaîne au dépôt du glycogène hépatique.

Ces deux conceptions laissent place à une interprétation plus souple, selon laquelle le foie, en tant que *glande endocrine* est capable, au début de son activité tout au moins, d'une *certaine autonomie fonctionnelle* (au même titre que la thyroïde par exemple) qui lui permet de stocker une certaine quantité — réduite — de glycogène. Mais cette activité ne devient vraiment importante que si une *stimulation externe*, hormonale, vient la renforcer, lui donner l'*impulsion* qui permet alors un stockage massif. Cette interprétation paraît être adoptée par JOST et JACQUOT dans leurs travaux sur les fœtus de Lapin et de Rat.

Les *arguments*, sur lesquels on peut s'appuyer pour tenter d'interpréter le mécanisme d'apparition du glycogène hépatique des embryons de Vertébrés, concernent la différenciation de la cellule hépatique, les variations de la glycémie fœtale, la recherche d'une apparition prématurée du glycogène et d'une stimulation hormonale de la cellule hépatique.

1. — DIFFÉRENCIATION CYTOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE DU FOIE EMBRYONNAIRE

Si l'on admet que l'apparition du glycogène dans la cellule hépatique correspond à l'acquisition d'une propriété physiologique nouvelle de cette cellule, il est possible que cette différenciation fonctionnelle se traduise par certaines modifications cytologiques ou biochimiques. Mais les critères morphologiques dont on dispose sont très aléatoires et probablement sans signification réelle.

a) *Différenciation cytologique.*

D'après NOEL et PIGEAUD (1930) le chondriome est déjà présent dans la cellule hépatique du fœtus humain au 2^e mois de la gestation sous forme de mitochondries uniformément réparties dans tout le cytoplasme. Ce n'est qu'au 5^e mois qu'apparaissent les chondriocontes typiques présentant — pour ces auteurs — des « signes certains d'activité élaboratrice ». Dès ce moment — qui correspond, rappelons-le, à l'apparition du glycogène — la cellule hépatique « se prépare par une activité au ralenti, à son rôle à venir ». Et NOEL admet implicitement que le foie prend alors le relais du placenta, en ce qui concerne le métabolisme glucidique.

Chez l'embryon de Poulet, DALTON (1934) a montré que le chondriome de la cellule hépatique se présente dès le 3^e jour de l'incubation sous forme de mitochondries grêles. Leur nombre et leur taille augmentent régulièrement jusqu'au 16^e jour, puis du 18^e jour jusqu'à l'éclosion, avec un accident (diminution du nombre) entre 16 et 18 jours. L'appareil de Golgi est déjà visible le 4^e jour sous forme d'un réseau serré qui ne subit qu'une évolution discrète pendant toute la vie embryonnaire.

Enfin selon HIBBARD (1928) le chondriome de la cellule hépatique du Discoglosse apparaît seulement au moment de la disparition du vitellus sous forme de « courts filaments s'insinuant entre les globules de graisse ».

Ces résultats, anciens, n'indiquent donc aucune modification fondamentale des organites connus pour jouer un rôle important dans le métabolisme cellulaire.

b) *Différenciation biochimique.*

L'absence de glycogène chimiquement dosable dans le foie fœtal du Cobaye avant le 57^e jour de la gestation paraît être due selon NEMETH, INSULL et FLEXNER (1954) à des facteurs cellulaires intrinsèques. Cette conclusion est basée : a) sur l'apparition du glycogène dans les muscles cardiaques et squelettiques longtemps avant l'apparition dans le foie fœtal (au moins le 39^e jour) ; b) sur l'impossibilité pour des coupes de foie fœtal de synthétiser *in vitro* le glycogène, jusqu'au moment où il est chimiquement démontré dans le foie *in vivo* et c) sur l'existence dans le

foie fœtal avant le 57^e jour des substances connues pour jouer un rôle fondamental dans la synthèse du glycogène à partir de glucose (hexokinase, phosphoglucomutase, glucose 1-6 diphosphate, phosphorylase, polysaccharides « primaires ») avec des teneurs comparables à celles observées chez l'adulte. Pour ces auteurs, l'absence de glycogène serait due à un nombre inadéquat de « priming end-groups » qui traduirait une certaine déficience relative de l'activité de « branching enzyme ». Par contre, NEMETH (1954) ne met en évidence la *glucose-6-phosphatase* dans le foie fœtal qu'en fin de gestation. Son activité est démontrable, mais très faible le 64^e jour, déjà plus importante à terme (le 66^e jour) et très marquée le 1^{er} jour de la vie post-natale. L'apparition brusque de cette diastase au moment de la naissance permet d'interpréter, selon NEMETH, la *disparition brutale* du glycogène hépatique observée par HARD et coll. (1944) dans les premières 24 heures qui suivent la mise bas.

Ainsi, selon ces auteurs, la différenciation fonctionnelle de la cellule hépatique, au point de vue biochimique s'opère en 3 stades : 1^o jusqu'au 57^e jour, pas de glycogène à cause d'une certaine déficience enzymatique ; 2^o à partir du 57^e jour, apparition du système diastasique complet (accroissement de l'activité des « branching enzyme » permettant la synthèse du glycogène à partir de glucose). En l'absence de *glucose-6-phosphatase*, ce glycogène ne peut être utilisé et il est stocké dans la cellule hépatique ; 3^o enfin l'apparition de cette dernière diastase au moment de la naissance permet la disparition rapide du glycogène accumulé.

Chez le Rat, des résultats semblables — tout au moins en ce qui concerne l'apparition de la *glucose-6-phosphatase* — sont indiqués par WEBER et CANTERO (1955). L'activité de cette diastase est nulle jusqu'au 16^e jour de la gestation. Elle devient mesurable le 19^e jour (mais correspond quantitativement au 1/100 de l'activité mesurée chez l'adulte) et atteint sa valeur maximum (supérieure à celle de l'adulte) le lendemain de la naissance. Il est possible que ce maximum d'activité corresponde, comme chez le Cobaye, à une chute post-natale du glycogène, mais il ne semble pas que les dosages aient été poursuivis au-delà du terme (JACQUOT, 1955).

Ces indications, pour intéressantes qu'elles soient, peuvent expliquer la disparition du glycogène à la naissance, impossible avant l'apparition de la *glucose-6-phosphatase*, mais le mécanisme du dépôt glycogénique reste purement hypothétique.

Chez l'embryon de Poulet, NOVIKOFF et coll. (1948) ont montré l'existence dès le 3^e jour de l'incubation de la plupart des produits intermédiaires phosphorylés du métabolisme glucidique, ce qui confirme les résultats de NEMETH et coll. (1954).

Rien de tel n'est connu chez les larves d'Amphibiens ⁽¹⁾. Rappelons cependant que la possibilité de synthèse du glycogène *in vitro* à partir de lactate, de pyruvate et de divers acides aminés (BEAUMONT, 1957 ;

(1) Sauf aux très jeunes stades du développement (voir BARTH et BARTH, 1954).

BELLEC, 1957) témoigne d'un équipement enzymatique important aux plus jeunes stades étudiés.

Signalons enfin que l'étude de la *croissance* du foie embryonnaire chez le Poulet (KINGSBURY, ALEXANDERSON et KORNSTEIN, 1956) et le Mouton (DICK, 1956) n'apporte aucune indication valable sur une éventuelle différenciation fonctionnelle.

2. — VARIATIONS DE LA GLYCÉMIE

On peut également penser que l'apparition du glycogène hépatique chez les embryons où les apports nutritifs se font exclusivement par voie sanguine (Oiseaux et Mammifères) est conditionnée par un accroissement de la glycémie qui atteindrait et dépasserait un certain seuil au-dessous duquel la cellule hépatique serait incapable de le stocker. Les variations de la glycémie au cours de la vie embryonnaire sont bien connues chez le Poulet et quelques Mammifères.

a) *Oiseaux*. — Tous les résultats des dosages indiquent effectivement une augmentation continue de la teneur du sang en glucose à partir d'un certain stade du développement. VLADIMIROFF et SCHMIDT (1926) et VLADIMIROV (1931) ne l'observent qu'après le 18^e jour, ZORN et DALTON (1936, 1937) entre 15 et 16 jours et ZWILLING (1948 *b*) entre 12 et 14 jours. Mais les valeurs de la glycémie mesurées par ces divers auteurs sont très comparables : 130 à 140 milligrammes 0/0 avant l'accroissement, 200 milligrammes environ à l'éclosion (adulte environ 160 milligrammes 0/0). ZWILLING (1948 *b*) ne constate aucune variation au moment où le foie commence à synthétiser le glycogène (6^e à 8^e jour), mais VLADIMIROV (1931) indique un premier accroissement de la glycémie entre 8 et 9 jours (110 à 136 milligrammes) suivi d'un palier jusqu'au 18^e jour.

b) *Mammifères*. — D'après NEEDHAM (1931) la glycémie fœtale en fin de gestation est toujours inférieure à la glycémie maternelle (sauf chez le Porc et la Vache). Cette exception est étendue par PASSMORE et SCHLOSSMANN (1938) au Mouton et à la Chèvre. Il n'y a donc pas de règle générale et il ne semble pas que l'évolution de la glycémie ait été systématiquement recherchée au cours de la gestation.

De toute façon, il ne paraît pas exister d'élévation de la glycémie au moment de l'apparition du glycogène hépatique (embryon de Poulet), mais postérieurement à ce stade.

3. — RECHERCHE D'UNE APPARITION PRÉMATURÉE

Chez les Vertébrés où le glycogène apparaît à un stade fixe du développement embryonnaire, des essais ont été tentés dans le but de provoquer une apparition prématurée, et de contrôler ainsi, si l'apparition normale correspond bien à l'acquisition d'une propriété nouvelle. *A priori*, on peut espérer provoquer un tel dépôt précoce : a) *en injectant des glucides* à l'embryon alors que le foie est encore vide de glycogène ; b) *en cul-*

tivant in vitro des cellules hépatiques (en culture histiotypique) ou des fragments de foie (en culture organotypique) sur milieu glucosé, à des stades jeunes ; c) en greffant des foies de jeunes embryons sur des embryons plus âgés déjà pourvus de glycogène ; et d) en injectant enfin certains produits hormonaux avant l'apparition normale. Toutes ces possibilités ont été exploitées chez l'embryon de Poulet, quelques-unes d'entre elles seulement chez le fœtus de Mammifère.

a) Une apparition prématurée par *administration de glucides* à l'embryon n'est bien démontrée que chez les Amphibiens (FAURÉ-FREMIET et DRAGOIU, 1923 ; BELLEC, 1958 et première partie de ce travail). Elle permet d'affirmer que le foie des larves d'Amphibiens peut accumuler du glycogène dès que l'intestin est capable d'absorber certains glucides, bien avant l'apparition normale, essentiellement tributaire des facteurs alimentaires. En outre, la précocité de cette apparition est limitée dans le temps par le début du fonctionnement intestinal, comme le montre l'injection directe de glucose à l'embryon. Par conséquent, la cellule hépatique des larves d'Amphibiens est fonctionnellement différenciée du point de vue de la synthèse glycogénique à un stade très jeune, au moment du recouvrement des branchies externes au moins.

Chez les Oiseaux, de telles injections glucidiques n'ont été faites qu'*après* l'apparition du glycogène (VLADIMIROV, 1931 ; KATAOKA, 1931 ; DALTON et HANZAL, 1940) et n'ont pas apporté de résultats positifs.

Il en est de même chez les Mammifères (en injectant du glucose à la mère, le placenta étant perméable au glucose) (COREY, 1935 b ; PASSMORE et SCHLOSSMANN, 1938) mais l'hyperglycémie provoquée se traduit, ici, par une augmentation de la teneur en glycogène du foie fœtal.

b) La culture *in vitro* des cellules hépatiques embryonnaires et la recherche de l'apparition du glycogène ont été entreprises avec succès par DOLJANSKI (1929 a, 1929 b, 1930, 1931) et NORDMANN (1929) chez l'embryon de Poulet et par NORDMANN chez le fœtus de Rat. Sur des milieux certainement non anhormonaux, les cellules hépatiques dépourvues de glycogène s'en chargent au bout de 24 heures, c'est-à-dire au 10^e jour de l'incubation chez le Poulet et au 17^e jour de la gestation chez le Rat. Cette accumulation est importante, peut subsister pendant plusieurs jours et paraît indépendante (NORDMANN, 1929) de la présence ou de l'absence du glucose dans le milieu.

La culture *organotypique* de foie embryonnaire sur divers milieux anhormonaux permet un stockage important, parfois massif de glycogène chez les Amphibiens (BELLEC, 1957 et 5^e partie de ce travail). Elle confirme les résultats obtenus *in vivo*, et démontre que le foie larvaire est capable de synthétiser du glycogène *sans aucune stimulation externe* hormonale ou nerveuse.

Chez les Mammifères, NEMETH et coll. (1954) ne peuvent obtenir de dépôt glycogénique dans des coupes de foie embryonnaire de Cobaye qu'à partir du moment où ce glycogène apparaît *in vivo* (57^e jour de la gestation) ce qui confirme leur interprétation biochimique.

c) De même, les greffes chorio-allantoïdiennes de foie d'embryon de Poulet prélevé avant l'apparition normale du glycogène (2^e ou 3^e jour d'incubation), sur des hôtes plus âgés dont le foie est déjà chargé, ne se chargent en glycogène que 24 heures après l'apparition normale (9^e jour : GUELIN-SCHEDRINA, 1936 ; 8 jours 1/3 : DALTON et HANZAL, 1937), ce délai de 24 heures étant imputé à la transplantation (cf. aussi NORDMANN, 1929, en culture *in vitro*).

Inversement, RIMNICEANU et coll. (1955) ont greffé sur la membrane chorio-allantoïdienne d'embryons de 3 à 8 jours, des pancréas de divers stades (9, 12, 14 et 18 jours). Mais aucun résultat n'a été obtenu, l'explication n'ayant pu être maintenue assez longtemps dans de bonnes conditions.

d) La recherche d'une apparition prématurée a enfin été tentée en injectant directement l'embryon avec divers produits hormonaux susceptibles d'exercer une influence sur le métabolisme glucidique.

GUELIN-SCHEDRINA n'a pu obtenir un tel dépôt précoce chez l'embryon de Poulet par la thyroxine (1934) ou l'insuline (1936). Mais RIMNICEANU et coll. notent une importante glycogénèse dès le 5^e jour, en injectant à des embryons de 3 jours, soit de l'insuline à très faible concentration (0,003 U.) soit des extraits de pancréas d'embryons de 9, 10, 12 et 18 jours. Ces résultats, qui demanderaient à être confirmés s'opposent donc à l'interprétation biochimique de NEMETH, confirmée par d'assez nombreux arguments expérimentaux. Il y a lieu de rappeler ici que les auteurs roumains insistent sur la variabilité d'apparition normale du glycogène chez l'embryon de Poulet ; cette apparition s'étendrait selon eux du 6^e au 10^e jour, selon la période de l'année.

Chez le fœtus de Rat, les seuls résultats positifs sont obtenus par ROSS et GOLDSMITH (1955) avec la cortisone à partir du 16^e jour de la gestation alors que la charge glycogénique ne s'effectue qu'entre 19 et 20 jours (JACQUOT, 1955).

Les résultats de ARON (1928 b) et FONTES et ARON (1929) relatifs à l'apparition précoce chez les larves d'Amphibiens par la thyroxine n'ont pu être confirmés (BELLEC, 1958 et 4^e partie de ce travail). Mais un dépôt prématuré fugace et assez peu important a été obtenu par la cortisone ou l'ACTH, qui n'a rien de comparable avec celui qu'obtiennent JOST et JACQUOT (1955) et JACQUOT (1956) chez les fœtus de Lapin et de Rat décapités, alors qu'une surcharge massive est déclenchée par une nourriture appropriée.

4. — STIMULATION HORMONALE

a) La démonstration d'une stimulation hormonale de la synthèse glycogénique par le foie embryonnaire a été faite par JOST et JACQUOT chez 2 Mammifères.

1^o Chez le Lapin, le glycogène est synthétisé en très faible quantité dès le 18^e jour de la gestation (LOCHHEAD et CRAMER, 1908), jusqu'à ce

qu'une stimulation hypophysaire, démontrée par la décapitation, détermine une augmentation brusque et considérable à partir du 25^e jour. En fait, le rôle de l'hypophyse ne se limite pas à cette action hépatique, mais paraît intéresser un certain nombre de glandes endocrines embryonnaires et jouer un rôle particulier dans leur fonctionnement entre 22 et 24 jours (thyroïde, testicule, cortex surrénal). Cette stimulation « comporte une *décharge* qui entraîne un véritable *virage* de la physiologie fœtale », au cours d'une « *crise* qui n'est pas sans rappeler la crise pubertaire ». La décapitation supprime cette « crise » et empêche la charge glycogénique. Les deux faits sont évidemment liés, mais il y a lieu de se demander si l'accroissement brusque de la teneur du glycogène hépatique fœtal n'est qu'un *accident temporaire*, étroitement subordonné à une décharge brutale d'ACTH et de corticoïdes, et suivi par une diminution ou une chute parallèle de cette teneur, comme c'est le cas chez le Cobaye à la naissance (HARD et coll., 1944) et la Souris vers le 20^e-22^e jour de la vie post-natale (ZORZOLI et CROUSE, 1954). Dans ce cas, la décapitation s'opposerait à cet accident mais rien ne permet d'affirmer qu'elle empêcherait tout dépôt ultérieur. En d'autres termes, s'il était possible d'obtenir le développement post-natal d'embryons seulement hypophysectomisés assisterait-on à la persistance de la teneur réduite qui caractérise les embryons avant la charge, ou, au contraire, à une augmentation lente et progressive, au cours de l'allaitement, par exemple ?

2^o Chez le Rat, par contre, les faits sont différents. La charge glycogénique du foie est plus progressive et subit un accroissement moins brutal entre 19 et 20 jours. L'hypophysectomie à 17 et 18 jours n'est pas suivie par un arrêt de la synthèse glycogénique qui se poursuit à un rythme comparable à celui qui précède la charge (JACQUOT, 1955). La surrénalectomie de la mère, à 19 jours, est pratiquement sans effet sur la charge des embryons décapités. A 18 jours elle diminue fortement leur teneur en glycogène mais ne s'oppose pas totalement à un accroissement de même rythme que chez les décapités de mère normale. Ce n'est qu'en surrénalectomisant la mère à 17 jours qu'une absence d'augmentation du glycogène peut être notée, dans un cas, à 21 jours.

Par contre la suppression de toute source d'hormones corticales à l'embryon (en surrénalectomisant à la fois la mère et le fœtus : JACQUOT, 1956) détermine l'absence à peu près totale du glycogène hépatique fœtal.

Ainsi chez le Rat, le rôle de l'hypophyse est plus *discret* que chez le Lapin et la charge glycogénique est principalement contrôlée par les hormones surrénaliennes maternelles et fœtales. Il est intéressant de constater à ce propos que l'histogenèse hypophysaire (JOST et TAVERNIER, 1956) ne montre pas les signes morphologiques d'une « crise », comme chez le Lapin, au moment de l'entrée en activité des glandes endocrines.

b) Chez l'embryon de Poulet, l'accroissement de la teneur en glycogène hépatique accompagne immédiatement son apparition physiologique (voir Introduction) et aucun accident particulier comparable à celui

observé chez le Lapin ne traduit l'installation d'une charge. Il ne semble pas, d'autre part, que l'hypophysectomie influe sur la teneur en glycogène. L'histogénèse de l'hypophyse (TIXIER-VIDAL, 1954) ne s'accompagne pas de modifications importantes pouvant traduire morphologiquement l'existence d'une « crise physiologique » comparable à celle du Lapin ⁽¹⁾. Enfin, mis à part les résultats de RIMNICEANU et coll. (1955), il n'est pas possible d'obtenir par des expériences variées un dépôt de glycogène avant son stade normal d'apparition. L'ensemble de ces faits est finalement assez favorable à l'interprétation biochimique de NEMETH.

c) Chez les Amphibiens Anoures, l'*histogénèse* de l'hypophyse, de la thyroïde et du pancréas est très progressive au cours de la vie larvaire (2^e partie de ce travail). La vraie « crise physiologique » se produit au moment de la métamorphose par des modifications hypophysaires, thyroïdiennes et pancréatiques importantes qui feront l'objet de publications ultérieures. L'*apparition* du glycogène hépatique ou l'*accroissement* de sa teneur ne sont pas liées à ces modifications comme le pensait ARON, mais sont essentiellement tributaires de l'*alimentation* larvaire (1^{re} partie). L'hypophysectomie ne s'oppose pas à la synthèse glycogénique à long terme, et le foie des têtards hypophysectomisés peut, si les conditions alimentaires sont favorables, se charger en glycogène histochimiquement décelable de façon massive (2^e partie) (dans ce cas, de nouveaux dosages sont nécessaires pour préciser quantitativement l'importance de cette accumulation) ⁽²⁾. Ces résultats sont confirmés par l'obtention d'un dépôt glycogénique important aussi bien *in vivo* avant la différenciation histologique de l'hypophyse, de la thyroïde, du pancréas et de l'organe interrénal (1^{re} partie) qu'*in vitro* en culture organotypique de foie larvaire sur milieu synthétique an hormonal (5^e partie).

En conclusion, il semble que dans l'ensemble des Vertébrés, le foie embryonnaire soit capable, au début de son fonctionnement tout au moins, de faire la synthèse du glycogène *sans intervention hormonale*, comme le foie adulte est apte à la réaliser dans ces conditions *in vitro*. Mais l'*importance* de cette période de fonctionnement an hormonal, et l'*aspect quantitatif* de cette synthèse varient selon les classes.

Chez les Mammifères, cette autonomie est *limitée*, et sans une stimulation hypophysaire du cortex surrénal — d'importance d'ailleurs variable selon les espèces — le taux du glycogène hépatique reste faible.

Chez les Amphibiens Anoures, au contraire, cette possibilité est *grande*, à la fois par l'absence de crise physiologique embryonnaire, et par une différenciation fonctionnelle très *précoce* de la cellule hépatique qui la rend apte à synthétiser le glycogène aux très jeunes stades larvaires.

⁽¹⁾ Sauf un léger accident au 19^e jour dû à une légère diminution des cellules A. P. S. positives.

⁽²⁾ La recherche du glycogène hépatique chez des embryons de Truite décapités paraît confirmer, par ses premiers résultats, ceux obtenus chez les Anoures (THOMOPOULOS, 1958, non publié).

BIBLIOGRAPHIE

- ADAMOFF (W.). — 1905. — Ein Beitrag zur Physiologie des Glykogens. *Zeitschrift f. Biol.*, **46**, 281-301.
- ADLER (L.). — 1914. — Metamorphosestudien on Batrachieslarven. I. Extirpation endokriner Drüsen A. Extirpation des Hypophyse. *Arch. Entw. Mech. Org.*, **39**, 21-45.
- AKAMATSU. — 1922. — Ueber Gewebeskulturen von Lebergewebe. *Virch. Arch.*, **240**, 308.
- ALBRAND (M.). — 1908. — Die Anlage der Zwischenniere bei den Urodelen. *Arch. f. mikr. Anat.*, **72**, 353-385.
- ALLEN (B. M.). — 1916. — Extirpation of the hypophysis and thyroid glands of *Rana pipiens*. *Anat. Rec.*, **11**, 486. — 1917. — Effects of the extirpation of the anterior lobe of the hypophysis of *Rana pipiens*. *Biol. Bull.*, **32**, 117-130.
- ALLEN (B. M.), TORREBLANCA (E. P.) et BENJAMIN (A. J.). — 1929. — A study upon the histogenesis of the pars anterior of the hypophysis of *Bufo* during metamorphosis. *Anat. Rec.*, **44**, 208-209 (abstract).
- ARON (M.). — 1920 a. — Sur l'histogenèse des îlots de Langerhans chez certains Mammifères. *C. R. Soc. Biol.*, **83**, 631-634. — 1920 b. — Sur le développement des îlots de Langerhans fonctionnels dans le pancréas embryonnaire. *C. R. Soc. Biol.*, **83**, 1445-1448. — 1920 c. — De la concomitance entre l'apparition des îlots de Langerhans fonctionnels chez l'embryon et l'établissement de la fonction glycogénique du foie. *Ibidem*, 1448-1450. — 1922 a. — L'évolution morphologique et fonctionnelle des îlots endocrines du pancréas embryonnaire. *Arch. d'Anat. d'Hist. et d'Embr.*, **2**, 69-113. — 1922 b. — Le glycogène du foie embryonnaire. Déterminisme de sa formation. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **4**, 209-222. — 1925. — Dégénérescence du pancréas au cours de la métamorphose chez *Rana esculenta*. Régénération consécutive de l'organe. *C. R. Soc. Biol.*, **93**, 678-680. — 1926. — Évolution de la thyroïde fœtale chez les Mammifères. Sa concordance avec l'évolution du pancréas endocrine. *C. R. Soc. Biol.*, **94**, 275. — 1928 a. — Le fonctionnement du pancréas chez les larves d'Amphibiens. *C. R. Soc. Biol.*, **99**, 213-214. — 1928 b. — Corrélation fonctionnelle entre la glande thyroïde et le pancréas endocrine chez les larves d'Amphibiens. *Ibid.*, 215-216. — 1929. — L'histogenèse de l'hypophyse chez les Mammifères. *C. R. Assoc. Anat.*, **24**, 26-34. — 1931. — Recherches histologiques sur le fonctionnement et les corrélations des glandes endocrines embryonnaires chez les Vertébrés. *Bull. Biol.*, **65**, 438-521. — 1933 a. — Expériences d'injections d'extrait préhypophysaire au fœtus de Cobaye *in utero*. Action sur la thyroïde. *C. R. Soc. Biol.*, **113**, 446-448. — 1933 b. — Injections d'extrait préhypophysaire au fœtus de Cobaye *in utero*. Action sur les îlots endocrines du pancréas. *C. R. Soc. Biol.*, **113**, 1071-1073.
- ARON (M.) et ALFONSI (N.). — 1924. — Recherches sur l'histogenèse et la physiogenèse comparée des îlots pancréatiques endocrines des Batraciens. *C. R. Soc. Biol.*, **91**, 609-611.
- ASTWOOD (E. B.). — 1943. — The chemical nature of compounds which inhibit the function of the thyroid gland. *J. Pharmac. and Exp. Therap.*, **78**, 79-89.
- ATWELL (W. J.). — 1918. — The development of the hypophysis of the Anura. *Anat. Rec.*, **15**, 73-92. — 1921. — The morphogenesis of the hypophysis in the tailed amphibia. *Anat. Rec.*, **22**, 373-390.
- BACCHUS (H.), HEIFFER (M. H.), ALTSZULER (N.). — 1952. — Potentiating effect of ascorbic acid on cortisone induced gluconeogenesis. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **79**, 648-650.
- BACH (S. J.), HOLMES (E. G.). — 1937. — The effect of insulin on carbohydrate formation in the liver. *Bioch. J.*, **31**, 89-100.
- BANERJEE (S.). — 1943. — *Ann. Biochem. Exper. Med.*, **3**, 171.
- BARTH (L. G.) et BARTH (I. J.). — 1954. — *The energetics of development*. Columbia U. Press, New York.
- BATAILLON (E.). — 1891. — Recherches anatomiques et expérimentales sur la métamorphose des Amphibiens Anoures. *Ann. Univ. Lyon*, **2**, 1-123.
- BEAUMONT (A.). — 1953 a. — Le pancréas du têtard d'*Alytes obstetricans* (Laurenti). *Arch. Anat. micr. Morph. exper.*, **42**, 32-40. — 1953 b. — Modifications histologiques du pancréas des larves de Batraciens Anoures au cours de la métamorphose.

- C. R. Soc. Biol.*, **147**, 56-58. — 1954. — L'apparition du glycogène hépatique chez les larves de Batraciens Anoures. *C. R. Soc. Biol.*, **148**, 29-31. — 1955. — Cortex surrénal et glycogène hépatique chez les larves de Batraciens Anoures. *C. R. Soc. Biol.*, **149**, 1734-1736. — 1956. — Sur la culture *in vitro* de foie larvaire d'Amphibien : apparition du glycogène en milieu synthétique. *C. R. Ac. Sc.*, **243**, 676-677. — 1957. — Apparition du glycogène en culture *in vitro* de foie larvaire d'Amphibien. *C. R. Ac. Sc.*, **245**, 1084-1087.
- BELLE (A.). — 1957. — Apparition du glycogène en culture *in vitro* de foie larvaire de Pleurodèle. *C. R. Soc. Biol.*, **111**, 1353-1355. — 1958. — Contribution à l'étude expérimentale de l'apparition du glycogène hépatique chez *Pleurodeles Watlîi* Michah. *Arch. Anat. micr. Morph. exper.*, **47**, 171-182.
- BENDALL (J. R.) et LEHMANN (H.). — 1942. — The influence of light and hormones on the glycogen synthesis in rat liver slices. *Bioch. J.*, **36**, 14.
- BERNARD (CL.). — 1859 a. — Sur une nouvelle fonction du placenta. *C. R. Ac. Sc.*, **48**, 77-86. — 1859 b. — De la matière glycogène considérée comme condition de développement de certains tissus, chez le fœtus, avant l'apparition de la fonction glycogénique du foie. *C. R. Ac. Sc.*, **48**, 673-684. — 1879. — *Leçons sur les phénomènes de la vie communs aux animaux et aux végétaux*. Paris, **2**, 103.
- BERTHET (J.), JACQUES (P.), HENNEMANE (G.) et DE DUVE (C.). — 1954. — Influences hormonales sur la synthèse de glycogène hépatique *in vitro*. *Arch. int. Physiol.*, **62**, 282-283. — 1955. — *In de Cûve* (1956).
- BIANCHINI (G.) et EVANGELISTI (P.). — 1922. — Les tissus du fœtus cultivés *in vitro* à distance variable de la mort. *Arch. ital. Biol.*, **71**, 207-226.
- BILEWICZ (ST.). — 1938. — Die Änderungen des Glycogengehaltes während der Metamorphose der Kaulquappen. *Bioch. Zeitschr.*, **297**, 379-385.
- BLOUNT (R. F.). — 1932. — Transplantation and extirpation of the pituitary rudiment and the effects upon pigmentation in the Urodele embryo. *J. exp. Zool.*, **63**, 113-141.
- BOCK (K. A.). — 1938. — Die Einwirkung von Nebennierenrinderentrakt auf den Ablauf der Thyroxinmetamorphose bei Froschlarven und beim Axolotl. *Klin. Wochenschr.*, **17**, 1311-1314.
- BRACHET (J.). — 1944. — *Embryologie chimique*. Masson et Cie, Paris.
- BRACHET (J.) et NEEDHAM (J.). — 1935. — Étude du métabolisme de l'œuf de Grenouille (*Rana fusca*) au cours du développement. 4. La teneur en glycogène de l'œuf de la segmentation à l'éclosion. *Arch. Biol.*, **46**, 821.
- BRITTON (S. W.). — 1930. — Maternal and foetal blood sugar changes under various experimental conditions. *Amer. J. Physiol.*, **95**, 178.
- BUCCI (G.). — 1951. — Le variazioni quantitative dell acido ascorbico durante la metamorfosi di *Bufo vulgaris*. *Riv. Biol.*, N. S., **43**, 4, 529-543.
- BUCHANAN (J. M.), HASTING (A. B.) et NESBETT (F. B.). — 1949 a. — The effect of the ionic environment on the synthesis of glycogen from glucose in rat liver slices. *J. B. C.*, **180**, 435-445. — 1949 b. — The effect of the ionic environment on the synthesis of glycogen and total carbohydrate from pyruvate in liver slices. *J. B. C.*, **180**, 447.
- CAMBAR (R.) et GIPOULOUX (J. D.). — 1956. — Table chronologique du développement embryonnaire et larvaire du Crapaud commun, *Bufo bufo* L. *Bull. biol. Fr. et Belg.*, **90**, 198-217.
- CAMBAR (R.) et MARROT (BR.). — 1954. — Table chronologique du développement de la Grenouille agile (*Rana dalmatina* Bon.). *Bull. biol. Fr. et Belg.*, **88**, 2, 168-177.
- CASE (J. F.). — 1952. — Adrenal cortical anterior pituitary relationships during embryonic life. *Ann. of the N. Y. Acad. of Sci.*, **55**, 147-158.
- CHEN (J. M.). — 1954. — The cultivation in fluid medium of organised liver, pancreas and other tissues of foetal rats. *Exper. Cell Res.*, **6**, 518-529.
- CHIU (C. Y.). — 1950. — The effect of adrenal cortical preparation added *in vitro* upon the carbohydrate metabolism of liver slices. 2. The effect of some pure steroids upon carbohydrate synthesis, oxygen uptake et non protein nitrogen. *Bioch. J.*, **46**, 120-124.
- CHIU (C. Y.) et NEEDHAM (D. M.). — 1948. — The effect of adrenal cortical hormone *in vitro* on carbohydrate synthesis in liver slices. *Bioch. J.*, **42**, XIX (Proceedings). — 1950. — The effect of adrenal cortical preparations added *in vitro* upon the carbohydrate metabolism of liver slices. 1. The effect of adrenal cortical extract (eschatin) upon synthesis of glycogen and of total carbohydrate. *Bioch. J.*, **46**, 114-120.

- CLARA (M.). — 1924. — Das Pankreas der Vögel. *Anat. Anz.*, **57**, 257-265.
- CLEMENTS (D. I.). — 1932. — Comparative histological studies of the thyroids and pituitaries in frog tadpoles in normal and accelerated metamorphosis. *J. Microsc. Soc.*, **52**, 138-148.
- CORDIER (R.). — 1948. — Sur l'aspect histologique et cytologique de l'hypophyse pendant la métamorphose de *Xenopus laevis*. *C. R. Soc. Biol.*, **142**, 11-12, 845-847. — 1949. — La réaction hypophysaire de la métamorphose chez *Xenopus laevis*. *C. R. Ass. Anat.*, **54**, 143-150. — 1953. — L'hypophyse de *Xenopus*. Interprétation biologique. *Ann. Soc. Roy. Zool. Belg.*, **84**, 1, 5-16. — 1954. — Cytologie hypophysaire et sa signification fonctionnelle chez l'Amphibien *Xenopus*. *C. R. Ass. Anat.*, **79**, 484-490.
- COREY (E. L.). — 1935 a. — Growth and glycogen content of the fetal liver and placenta. *Am. J. Physiol.*, **112**, 263-267. — 1935 b. — Fetal carbohydrate metabolism following adrenalectomy, insulin, and glucose experiments on the mother. *Am. J. Physiol.*, **113**, 450-454.
- CROSS (M. C. A.) et HOLMES (E.). — 1937. — The effect of toxæmia on the metabolism of the liver. Diphtheritic toxæmia and carbohydrate synthesis. *Brit. J. exp. Path.*, **18**, 370-390.
- DALTON (A. J.). — 1934. — The ontogenic history of the mitochondria and Golgi network of the hepatic cell of the chick. *Anat. Rec.*, **58**, 321-347. — 1937. — The functional differentiation of the hepatic cells of the chick embryo. *Anat. Rec.*, **68**, 393-405.
- DALTON (A. J.) et HANZAL (R. F.). — 1937. — The chick embryo as a test organism in the study of the mechanism of carbohydrate metabolism. *Anat. Rec.*, **70**, suppl. 1, p. 33. — 1940. — Carbohydrate metabolism of the chick embryo. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **45**, 278-281.
- D'ANGELO (S. A.). — 1941. — An analysis of the morphology of the pituitary and thyroid glands in amphibian metamorphosis. *Am. J. Anat.*, **69**, 407-437.
- DEANE (H. W.), NESBETT (F. B.), BUCHANAN (J. M.) et HASTINGS (A. B.). — 1947. — A cytochemical study of glycogen synthesised from glucose or pyruvate by liver slices *in vitro*. *J. Cell. comp. Physiol.*, **30**, 255-269.
- DEANE (H. W.), NESBETT (T. B.) et HASTINGS (A. B.). — 1946. — Improved fixation for histological demonstration of glycogen and comparison with chemical determination in liver. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **63**, 401-406.
- DELSOL (M.). — 1952. — Action du thiouracile sur les larves de Batraciens. Neoténie expérimentale. Rôle de l'hypophyse dans ce phénomène. *Arch. Biol.*, **63**, 279-392.
- DETWILER (S. R.), COPENHAVER (W. M.) et ROBINSON (C. O.). — 1947. — The survival of *Amblystoma* embryos when treated with sodium sulfadiazine and quinine sulphate. *J. exp. Zool.*, **106**, 109.
- DICK (D. A. T.). — 1956. — Growth and function in the foetal liver. *J. Embr. exper. Morphol.*, **4**, 2, 97-109.
- DIMOND (M. T.). — 1952. — The embryology of the thyroid gland in the snapping turtle. *Chelydra serpentina serpentina*. Master's Diss. Catholic U. of America.
- DOBROWOLSKY (N. A.). — 1916. — Sur la culture des tissus des Poissons et d'autres animaux inférieurs. *C. R. Soc. Biol.*, **79**, 789-792.
- DOLJANSKI (L.). — 1929 a. — Cultures pures de tissu hépatique *in vitro*. *C. R. Soc. Biol.*, **101**, 754-755. — 1929 b. — Sur la morphologie des cultures pures des cellules hépatiques *in vitro*. *C. R. Soc. Biol.*, **102**, 629-631. — 1930. — Le glycogène dans les cultures de foie. *C. R. Soc. Biol.*, **105**, 504-506. — 1931. — Sur les cultures pures de foie. *Arch. f. exp. Zellf.*, **11**, 261-271.
- DOWHOFFER (C.). — 1933. — Studies on the carbohydrates metabolism of the chick embryo. *Bioch. J.*, **27**, 806-817.
- DRAGOIU (J.) et FAURÉ-FREMIET (E.). — 1921 a. — Divers aspects de la cellule hépatique chez les têtards de *Rana temporaria* nourris avec de la thyroïde. *C. R. Soc. Biol.*, **85**, 434-436. — 1921 b. — Étude histologique des phénomènes provoqués chez le têtard de *Rana temporaria* par l'alimentation thyroïdienne. *C. R. Soc. Biol.*, **85**, 437-439.
- DUVE (C. DE). — 1956. — The hepatic action of insulin. *Ciba Found. Coll on Endocr.*, **9**, 203-222.
- EGGERT (B.). — 1934. — Die embryonale Differenzierung der Schilddrüse und des ultimobranchialen Körpers von *Lacerta agilis* L. und *L. vivipara* Jacq. *Z. Wiss. Zool.*, **687-710**.

- FALES (C. H.). — 1949. — Changes in the amount and position of liver glycogen following variations of the metabolic rate in the newt, *Triturus viridescens*. *Anat. Rec.*, **103**, 449, abstract.
- FARAGGIANA (R.). — 1934. — Ricerche sull istogenesi del pancreas di Anfibi anuri con particolare riguardo alle isole del Langerhans. *Arch. Ital. Anat. Embr.*, **34**, 72-121.
- FAURÉ-FREMIET (E.) et DRAGOIU (J.). — 1923. — Le premier cycle de croissance du têtard de *Rana temporaria*. *Arch. Int. Physiol.*, **21**, 403-437.
- FAURÉ-FREMIET (E.) et DU VIVIER DE STREEL. — 1921. — Les constituants chimiques de l'œuf et leur rôle dans le développement embryonnaire chez la Grenouille rousse (*Rana temporaria*). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **3**, 8, 476-481.
- FONTES (M.) et ARON (M.). — 1929. — Mode d'action qualitative et quantitative de la thyroxine synthétique. Son influence sur la métamorphose des larves d'Anoures. *C. R. Soc. Biol.*, **102**, 679.
- FRIEDEN (E.) et NAILE (B.). — 1955. — Biochemistry of Amphibian metamorphosis : I. Enhancement of induced metamorphosis by glucocorticoids. *Science*, **121**, 3132, 37-39.
- GABE (M.). — 1947. — Sur l'emploi du picrate de vert de méthyle pour la différenciation de la coloration d'Altmann. *Bull. Histol. appl.*, **24**, 5-9. — 1953. — Sur quelques applications de la coloration par la fuchsine paraldehyde. *Bull. micro. appl.*, 2^e série, **3**, 153-162. — 1957. — Communication verbale. — 1958. — Communication verbale.
- GALLIEN (L.) et HOULLON (C.). — 1951. — Table chronologique du développement chez *Discoglossus pictus*. *Bull. Biol.*, **85**, 373-375.
- GARGANO (C.). — 1923. — La cultura dei tessuti dei Selacci *in vitro*. *Publ. d. Stat. Zool. Napoli*, **4**, 13-113.
- GASCHE (P.). — 1939. — Beitrag zur Kenntnis der Entwicklung von *Salamandra salamandra*, mit besonders Berücksichtigung der Winterphase, der Metamorphose und des Verhaltens der Schilddrüse (Glandula thyreoidea). *Rev. Suisse Zool.*, **46**, 403-548. — 1945. — Einwirkung von Desoxycorticosteron-acetat (Percorten) auf Larven von *Xenopus laevis* in den verschiedenen Metamorphosestadien. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*, **3C**, 10.
- GEMMILL (C. L.) et HOLMES (E. G.). — 1935. — The formation of carbohydrate from fat in the liver of the rat. *Bioch. J.*, **29**, 338.
- GILL (P. M.). — 1938. — The effect of adrenaline on embryonic chick glycogen *in vitro* as compared with its effect *in vivo*. *Biochem. J.*, **32**, 1792-1799.
- GIROUD (A.) et LEBLOND (C. P.). — Détection chimique de l'acide ascorbique ou vitamine C. *Bull. Histol. appl.*, **11**, 375-378.
- GOLDFEDEROVA (A.). — 1926. — Le glycogène au cours de l'ontogenèse de la Grenouille et sous l'influence des saisons. *C. R. Soc. Biol.*, **95**, 801-804.
- GORBMAN (A.) et EVANS (H. M.). — 1941. — Correlation of histological differentiation with beginning of function of developing thyroid gland of frog. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **47**, 103-106.
- GORDON (A. S.), GOLDSMITH (E. D.) et CHARIPPER (H. A.). — 1943. — Effect of thiourea on development of the amphibian. *Nature*, **154**, 504-505. — 1945. — The effects of thiourea on amphibian development. *Growth*, **9**, 19-41.
- GUELIN-SCHEDRINA (A.). — 1934. — Effects de la thyroxine sur l'embryon de Poulet. *Ann. Physiol. Physicoch. Biol.*, **10**, 453-461. — 1936. — Fonction glycogénique du foie chez l'embryon de Poulet. *C. R. Soc. Biol.*, **121**, 144.
- HANAN (E. B.). — 1925. — Experimental hypoglycemia and hyperglycemia in the chick embryo. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **22**, 501-504.
- HARD (W.). — 1944. — The origin and differentiation of the alpha and beta cells in the pancreatic islets of the rat. *Am. J. Anat.*, **75**, 369-398.
- HARD (W. L.), REYNOLDS (O. E.) et WINBURY (M.). — 1944. — Carbohydrate, fat, and moisture relationships in the pregnant, fetal and newborn guinea-pig. *J. Exp. Zool.*, **96**, 189-199.
- HASTINGS (A. B.), BUCHANAN (J. M.). — 1942. — The role of the intracellular cations on liver glycogen formation *in vitro*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **28**, 478-482.
- HERBAIN (M.). — 1953. — Le microdosage du glycogène hépatique. Son application aux prélèvements biopsiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **35**, 1421-1436.
- HERLANT (M.). — 1950. — Méthodes nouvelles applicables à l'étude histologique du lobe antérieur de l'hypophyse. *Ann. Endocr.*, **6**, 644-647.

- HIBBARD (H.). — 1928. — Contribution à l'étude de l'ovogenèse, de la fécondation et de l'histogenèse chez *Discoglossus pictus*, Otth. *Arch. Biol.*, **38**, 3-78.
- HILL (B. H.). — 1935. — The early development of the thyroid gland in *Amia calva*. *J. Morph.*, **57**, 533-545.
- HIRATA (K.). — 1934. — On the histogenesis of the island of Langerhans in *Rana japonica* (Günther). *Sci. Repts. Tohoku Imp. Univ.*, **9**, 159-182.
- HOLTFRETER (J.). — 1931. — Ueber die Aufzucht isolierter Teile des Amphibienkeimes. II. Züchtung von Keimen und Keimteilen in Salzlösung. *Roux' Arch.*, **124**, 404-466.
- HOSKINS (E. R.) et HOSKINS (M. M.). — 1917. — On thyroidectomy in Amphibia. *Anat. Rec.*, **11**, 363. — 1918. — Further experiments with thyroidectomy in Amphibia. *Proc. Soc. exp. Biol.*, **15**, 7, 102-104.
- HUGHES (A. M.) et ASTWOOD (E. B.). — 1944. — Inhibition of metamorphosis in tadpoles by thiouracil. *Endocr.*, **34**, 138-139.
- INGLE (D. J.). — 1940. — Diabetogenic effect of some cortin-like compounds. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, **44**, 176-177.
- JACQUOT (R.). — 1955. — Recherches sur le contrôle hormonal du glycogène hépatique chez le fœtus de Rat. *J. Physiol.*, **47**, 857-866. — 1956. — Surrénale et fonction glycogénique du foie chez l'embryon de Rat. *C. R. Soc. Biol.*, **150**, 12, 2137-2140.
- JAILER (J. W.). — 1950. — The maturation of the pituitary-adrenal axis in the new-born Rat. *Endocr.*, **46**, 420-425.
- JAMES (M. S.). — 1946. — The role of the basibranchial cartilages in the early development of the thyroid of *Hyla regilla*. *U. Calif. Publ. Zool.*, **51**, 215-228.
- JANES (R. G.). — 1938. — Studies on the amphibian digestive system. III. The origin and development of pancreatic islands in certain species of Anura. *J. Morph.*, **62**, 375-392.
- JORDAN (P.). — 1928. — Ueber die Bedeutung des embryonalen Glycogens, insbesondere für das Wachstum. *Z. Zellf. mikr. Anat.*, **6**, 558-586.
- JOST (A.). — 1947. — Recherches sur la différenciation sexuelle de l'embryon de Lapin. *Arch. Anat. micr. Morph. exp.*, **36**, 151-315. — 1948. — Influence de la décapitation sur le développement du tractus génital et des surrénales de l'embryon de Lapin. *C. R. Soc. Biol.*, **142**, 273-275. — 1951. — Recherches sur la différenciation sexuelle de l'embryon de Lapin. IV. Organogenèse sexuelle masculine après décapitation du fœtus. *Arch. Anat. micr. Morph. exp.*, **40**, 247-281. — 1953 a. — Problems of fetal endocrinology : the gonadal and hypophyseal hormones. *Rec. Prog. Horm. Res.*, **8**, 379-413. — 1953 b. — Sur le développement de la thyroïde chez le fœtus de Lapin décapité. *Arch. Anat. micr. Morph. exp.*, **42**, 168-181. — 1954. — Hormonal factors in the development of the fetus. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, vol. **19** : The mammalian fetus : Physiological aspects of development, 167-181. — 1955. — Le rôle des corrélations endocrines dans le développement de l'embryon de Lapin. *Acta physiol. pharmacol. neerl.*, **4**, 97-103.
- JOST (A.) et GONSE (P.). — 1953. — Application de la méthode à l'acide periodique-Schiff (MacManus) à l'étude histophysique de l'hypophyse fœtale du Lapin. *Arch. Anat. micr.*, **42**, 243-273.
- JOST (A.) et HATEY (J.). — 1949. — Influence de la décapitation sur la teneur en glycogène du foie du fœtus de Lapin. *C. R. Soc. Biol.*, **143**, 146-147.
- JOST (A.) et JACQUOT (R.). — 1954. — Recherches sur le contrôle hormonal de la charge en glycogène du foie fœtal du Lapin et du Rat. *C. R. Ac. Sc.*, **239**, 1, 98-100. — 1955. — Recherches sur les facteurs endocriniens de la charge en glycogène du foie fœtal chez le Lapin (avec des indications sur le glycogène placentaire). *Ann. Endocr.*, **16**, 849-872.
- JOST (A.), MOREL (F. F.) et MAROIS (M.). — 1949. — Données préliminaires sur la fixation de radio-iode ¹³¹I par la thyroïde fœtale du Lapin. *C. R. Soc. Biol.*, **143**, 142-145. — 1952. — Nouvelles recherches à l'aide du radio-iode ¹³¹I sur la fonction thyroïdienne du fœtus de Lapin décapité. *C. R. Soc. Biol.*, **146**, 1066-1070.
- JOST (A.) et TAVERNIER (R.). — 1956. — Application de la méthode à l'acide periodique-Schiff (MacManus) à l'étude de l'hypophyse fœtale du Rat. *C. R. Ac. Sc.*, **243**, 18, 1353-1356.
- JURAND (A.). — 1949. — The effect of alloxan on the growth and development of the tadpole of *Rana temporaria* (L.). *Bull. Acad. pol. Sc. Lettres*, 165-191.
- KAPPERS (J. A.). — 1956. — The development of the brain. In NIEUWKOPF (P. D.) et FABER (J.), 52-59.

- KATAOKA (E.). — 1931. — Embryochemische Untersuchungen mittels der Injektionsmethode. V. Ueber das Verhalten des Glykogens im bebrüteten Hühnerei bei Zuckerinjektion. *Z. physiol. Chem.*, **203**, 272-278.
- KERR (M. A.). — 1939. — On the histology of the developing pituitary in the frog (*Rana temporaria*) and in the toad (*Bufo bufo*). *Pr. Zool. Soc. London*, série B, **109**, 167-180.
- KINGSBURY (J. W.), ALEXANDERSON (M.) et KORNSTEIN (E.). — 1956. — The development of the liver in the chick. *Anat. Rec.*, **124**, 165-188.
- KOEPF (C. F.), HORN (H. W.), GEMMILL (C. L.) et THORN (G. W.). — 1941. — The effect of adrenal cortical hormone on the synthesis of carbohydrate in liver slices. *Amer. J. Physiol.*, **135**, 175-186.
- KONIGSBERG (I. R.). — 1954. — The effects of early pituitary removal by decapitation on carbohydrate metabolism in the chick embryo. *J. Exp. Zool.*, **125**, 1, 151-169.
- KONOPACKI (M.). — 1924. — Sur le glycogène dans le développement des embryons de Grenouille. *C. R. Soc. Biol.*, **91**, 973-975.
- KOPSCH (F.). — 1952. — *Die Entwicklung des braunen Grasfrosches Rana fusca (Roesel)*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- KROSZCZYNSKI (St.). — 1924. — L'action de l'insuline sur les têtards. *C. R. Soc. Biol.*, **91**, 963-966.
- KUUSISTO (A. N.) et TELKKA (A.). — The effect of cortisone on thyroid function in tadpoles. *Acta Endocr.*, **13**, 61-68.
- LAGUESSE (E.). — 1906. — Le pancréas. *Rev. Génér. Histol.*, **1**, 1-288.
- LEE (W. H.). — 1951. — The glycogen content of various tissues in the chick embryo. *Anat. Rec.*, **110**, 465-474.
- LEIBSON (L. G.). — 1950. — Glycogen content in the liver in chick embryos in various stages of incubation (en russe). *Fizol. Zhur.*, **36**, 191-202. — 1951. — Influence de l'insuline sur la teneur en glycogène du foie de l'embryon de Poulet (en russe). *Fiziol. Zh. S. S. S. R.*, **37**, 3, 343-348.
- LEVI (G.). — 1922. — Osservazioni sulla struttura della cellula epatica vivente coltivata *in vitro*. *Giorn. R. Accad. Med.*, série 6, **28**, 345-349.
- LEWIS (W. H.). — 1922. — Endothelium in tissue cultures. *Amer. J. Anat.*, **30**, 39-49.
- LIÈVRE (F.). — 1957. — Contribution à l'histogénèse du pancréas endocrine chez l'embryon de Poulet. *Arch. Anat. micr. Morph. exp.*, **46**, 61-80.
- LILLIE (R. D.). — 1954. — *Histopathologic technic and practical histochemistry*. Blakiston C. New York.
- LISON (L.). — 1953. — *Histochimie et cytochimie animales. Principes et méthodes*. Gauthier-Villars, édit., Paris.
- LIU et LI. — 1930. — The changes in the digestive system of *Rana nigromaculata* and *Kaloulea borealis* during metamorphosis. *Peking Soc. Nat. Hist. Bull.*, **4**, 67-94.
- LOCHHEAD (J.) et CRAMER (W.). — 1908. — The glycogen changes in the placenta and the foetus of the pregnant rabbit: a contribution to the chemistry of growth. *Proc. Roy. Soc. London*, série B, **80**, 263-284.
- LONG (C. N. H.). — 1937. — Studies on the « diabetogenic » action of the anterior pituitary. *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*, **5**, 344-356. — 1947. — The relation of cholesterol and ascorbic acid to the secretion of adrenal cortex. *Recent Progress in Hormone Research*, **1**, 99-122.
- LONG (C. N. H.), KATZIN (B.) et FRY (E.). — 1940. — Adrenal cortex and carbohydrate metabolism. *Endocr.*, **26**, 309-344.
- LYNCH (R. S.). — 1921. — The cultivation of liver cells of the chick embryo *in vitro*. *Am. J. Anat.*, **29**, 281-311.
- LYNN (W. G.). — 1936. — A study of the thyroid in embryos of *Eleutherodactylus nubicola*. *Anat. Rec.*, **64**, 525-539. — 1942. — The embryology of *Eleutherodactylus nubicola* an anuran which has no tadpole stage. *Carnegie Cont. Embryol.*, **30**, 27-62.
- McKEE (R. W.), COBBEY (T. S.) et GEIMAN (Q. M.). — 1949. — The effect of administered adrenal cortical hormones on the liver glycogen of normal and scorbutic guinea-pigs. *Endocr.*, **45**, 21-28.
- MENDEL (L. B.) et LEAVENWORTH (C. S.). — 1907. — Chemical studies in growth. III. The occurrence of glycogen in the embryo pig. *Am. J. Physiol.*, **20**, 117-126.
- MITSUDA. — 1924. — Untersuchungen über Transplantationen und Explantation

- von Lebergewebe unter besonderer Berücksichtigung der Pigmentfrage. *Virch. Arch.*, **248**, 91.
- MÜLLER (W.). — 1871. — Ueber die Entwicklung der Schilddrüse. *Jena Z. Med. Naturw.*, **6**, 428-453.
- MURRAY (H. C.) et MORGAN (A. F.). — 1946. — Carbohydrate metabolism in the ascorbic acid deficient guinea pig under normal and anoxic conditions. *J. Biol. Chem.*, **163**, 401-410.
- NADEL (E. M.), MULAY (A. S.) et SASLAW (L. D.). — 1955. — On the failure of glycogen deposition in the livers of scorbutic guinea pigs. *Endocr.*, **56**, 584-589.
- NEEDHAM (J.). — 1931. — *Chemical embryology*. Cambridge.
- NEMETH (A. M.). — 1954. — Glucose-6-phosphatase activity in the liver of the fetal guinea pig. *J. Biol. Chem.*, **208**, 773-776.
- NEMETH (A. M.), INSULL (W.) et FLEXNER (L. B.). — 1954. — Glycogenesis in the liver of the fetal guinea pig. *J. Biol. Chem.*, **208**, 765-772.
- NERENBERG (S. T.). — 1954. — Beta granules of islets of Langerhans of rat ; a study of their development under normal and abnormal conditions. *Arch. Pathol.*, **58**, 236.
- NIEUWKOOP (P. D.) et FABER (J.). — 1956. — *Normal table of Xenopus laevis (Daudin)*. North-Holland Publ. Comp. Amsterdam.
- NIU (M. C.) et TWITTY (V. C.). — 1953. — The differentiation of gastrula ectoderm in medium conditioned by axial mesoderm. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **39**, 985-989.
- NOEL (R.) et PIGEAUD (H.). — 1930. — Le chondriome de la cellule hépatique aux différents stades de la vie intra-utérine chez l'Homme. *Bull. Histol. appl.*, **7**, 33-43.
- NORDMANN (M.). — 1929. — Wachstum und Stoffwechsel der Leberzellen in der Gewebeskultur. *Arch. f. exper. Zellf.*, **8**, 371-414.
- NOVIKOFF (A. B.), POTTER (V. R.) et LEPAGE (G. A.). — 1948. — Phosphorylating glycolysis in the early chick embryo. *J. Biol. Chem.*, **173**, 239-252.
- O'CONNOR (R. J.). — 1953. — Metabolism and glycogen formation in the liver of the chicken embryo. *J. Embryol. Exp. Morph.*, **1**, 105-114.
- OHASHI (Y.). — 1925. — Comparison of the distributions of glycogen in mammals and anura. *Japan Med. World.*, **29**.
- ORTMAN (R.). — 1956. — Two types of acidophils in the anterior pituitary of the frog and their relation to the periodic acid Schiff reaction. *J. Histochem. Cytochem.*, **4**, 471-475.
- OSTERN (P.), HERBERT (D.) et HOLMES (E.). — 1939. — Formation and breakdown of glycogen in the liver. *Bioch. J.*, **33**, 1858-1878.
- PASSMORE (P.) et SCHLOSSMANN (H.). — 1938. — The effect of large doses of insulin on the foetal sheep and goat. *J. Physiol.*, **92**, 459-466.
- PASTEELS (J. L.) Jr. — 1957. — Recherches expérimentales sur le rôle de l'hypothalamus dans la différenciation cytologique de l'hypophyse chez *Pleurodeles Waltlii*. *Arch. Biol.*, **68**, **1**, 65-114.
- PAWLIKOWSKI (T.). — 1934. — Sur le fonctionnement précoce du système interrénal chez *Amblystoma mexicanum*. *C. R. Soc. Biol.*, **115**, 1265-1266.
- PFLÜGER (E.). — 1903. — Ueber den Glykogenegehalt der fötalen Leber. *Arch. f. ges. Physiol.*, **95**, 19-22.
- POLICARD (A.). — 1924. — Documents cytologiques sur les éléments du foie foetal de mammifère cultivés *in vitro*. *C. R. Ass. Anat.*, 19^e réunion, Strasbourg, **247**, 54.
- POTVIN (E.) et ARON (M.). — 1927. — Recherches sur l'évolution embryonnaire des îlots pancréatiques endocrines chez le Poulet. *C. R. Soc. Biol.*, **96**, 267.
- PRESTON (M. M. E.). — 1949. — The cultivation *in vitro* of various amphibian tissues. *J. Roy. Micr. Soc.*, **69**, 65-71.
- PURVES (H. D.) et GRIESBACH (W. E.). — 1951. — The site of thyrotrophin and gonadotrophin production in the rat pituitary studied by McManus-Hotchkiss staining for glycoprotein. *Endocr.*, **49**, 244-264.
- RACADOT (J.). — 1949. — *Cytogenèse de la glande pituitaire chez quelques Mammifères*. Thèse Médecine, Nancy.
- RAWSON (R. W.), RALL (J. E.) et SONENBERG (M.). — 1955. — The chemistry and physiology of the thyroid, in *The hormones*, vol. **3**, Acad. Press, New York.
- RAYNAUD (A.) et FRILLEY (M.). — 1947. — Destruction du cerveau des embryons de Souris au 13^e jour de la gestation, par irradiation au moyen des rayons X. *C. R. Soc. Biol.*, **141**, 658-662.
- REINECKE (R. M.) et KENDALL (E. C.). — 1942. — Method for bio-assay of hormones

- of adrenal cortex which influence deposition of glycogen in ther liver. *Endocr.*, **31**, 573-577.
- RIMNICEANU (C.), MICLEA (C.) et LUNGULESCU-DRAGAN (M.). — 1955. — Glicogeniza în cursul dez voltarii embrionului de gaina. *Bul. Sti. sect. Sti. Med.*, **7**, 3, 959-980.
- ROMANOFF (A. L.) et ROMANOFF (A. J.). — 1949. — *The avian egg*. 1 vol., 918 pages. J. Wiley, édit., New York.
- ROSKAM (J.). — 1953. — Une médication hormonopoïétique : la salicylothérapie. *Exp. Ann. Bioch. Med.*, 31-51.
- ROSS (L.) et GOLDSMITH (E. D.). — 1955. — Histochemical studies of effects of cortisone on fetal and newborn rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **90**, 50-55.
- ROSSI (M. R.). — 1956. — Il comportamento del glicogeno durante la metamorfosi de *Rana*. *Riv. Istochim.*, **2**, 331.
- RUGH (R.). — 1948. — *Experimental embryology. A manuel of techniques and procedures*. Burgess Publishing Comp. Minneapolis.
- SAMES (G. L.) et LEATHEM (J. H.). — 1952. — Influence of adrenal steroids on chick embryos. *Anat. Rec.*, **113**, 568.
- SANDERS (A.). — 1935. — The development of the thyroid gland in urodeles. *J. Morph.*, **57**, 597-618.
- SAXEN (L.). — 1956. — The onset of thyroid activity in relation to the cytodifferentiation of the anterior pituitary. Histochemical investigation using amphibian embryos. *Acta Anat. (sous presse)*.
- SAXEN (L.), SAXEN (E.) et TOIVONEN (S.). — 1956. — Determination of thyroid activity by quantitative microdensimetry using ¹³¹I. *Ann. Med. Exp. Fenn.*, **34**, 7-14.
- SAXEN (L.), SAXEN (E.) et SALIMAKI (K.). — 1957. — The anterior pituitary and the thyroid function during normal and abnormal development of the frog. *Ann. Zool. Soc.*, Vanamo, **18**, 1-44.
- SAXEN (L.) et TOIVONEN (S.). — 1955. — The development of the ultimobranchial body in *Xenopus laevis* Daudin and its relation to the thyroid gland and epithelial bodies. *J. Embr. Exp. Morph.*, **3**, 376-384.
- SAYERS (G.) et SAYERS (M. A.). — 1948. — *The pituitary-adrenal system. Recent progress in hormone research*. Ac. Press Inc. N. Y., **2**, 81-115.
- SCHLIEFER (W.). — 1935. — Die Entwicklung der Hypophyse bei Larven von *Bufo vulgaris* bis zur Metamorphose. *Zool. Jahrb. Abt. f. Anat. u. Ontog. d. Tiere*, **59**, 383-454.
- SCHLOSSMANN (H.). — 1938. — The carbohydrate metabolism of the fetal dog under the influence of insulin. *J. Physiol.*, **92**, 219-227.
- SCHRECKENBERG (M. G.). — 1956. — The embryonic development of the thyroid gland in the frog, *Hyla brunnea*. *Growth*, **20**, 295-313.
- SECKEL (H. P. G.). — 1938 *a*. — The influence of various physiological substances on the glycogenolysis of surviving rat liver. *Endocr.*, **23**, 751-759. — 1938 *b*. — The influence of various physiological substances on the glycogenolysis of surviving rat liver. The influence of insulin added *in vitro*. *Endocr.*, **23**, 760. — 1940. — The influence of various physiological substances on the glycogenolysis of surviving rat liver. *Endocr.*, **26**, 97-101.
- SEGAL (S. J.). — 1953. — Morphogenesis of the estrogen induced hyperplasia of the adrenals in larval frogs. *Anat. Rec.*, **115**, 205-230.
- SKLOWER (A.). — 1925. — Das incretorische System in Lebenscyclus des Frosche (*Rana temporaria* L.). I. Schilddrüse, Hypophyse, Thymus und Keimdrüsen. *Z. Vergl. Physiol.*, **2**, 474-523.
- SLUCZEWSKI (A.) et ROTH (P. C. J.). — 1952. — Action de la cortisone et de l'ACTH sur les Axolotls (*Amblystoma tigrinum* Green) en fonction du pH du milieu ambiant. *C. R. Soc. Biol.*, **146**, 1927-1929.
- SMIRNOV (V.). — 1916. — Sur la culture des tissus en dehors de l'organisme (cœur, foie, rein). *C. R. Soc. Biol.*, **79**, 794-796.
- SMITH (P. E.). — 1916-1917. — The effect of hypophysectomy in the early embryo upon the growth and development of the frog. *Anat. Rec.*, **11**, 57-64. — 1920. — The pigmentary growth and endocrine disturbances induced in the anuran tadpole by the early ablation of the pars buccalis of the hypophysis. *Am. Anat. Mem.*, **11**.
- SOULIE (A. H.). — 1903. — Recherches sur le développement des capsules surrénales chez les Vertébrés supérieurs. *J. Anat. et Physiol.*, **39**, 197-293.

- SRDINKO (O. V.). — 1900. — Bau und Entwicklung der Nebenniere bei Anuren. *Anat. Anz.*, **18**, 500-508.
- STADIE (W. C.), LUKENS (F. D. W.) et ZAPP (J. A.), Jr. — 1940. — The effect of insulin upon urea formation, carbohydrate synthesis and respiration of liver of normal and diabetic animals. *J. Biol. Chem.*, **132**, 393.
- STEINMETZ (C. H.). — 1950. — Some effects of 2-thiouracil on *Rana clamitans* larvæ. *Proc. Indiana Acad. Sci.*, **60**, 324-328. — 1952. — Further evidence for thyroid function in Anuran larvæ. *Proc. Indiana Acad. Sci.*, **61**, 292-295. — 1954. — Some effects of thyroxine and antithyroid compounds on tadpoles and their relation to hormonal control of growth. *Physiol. Zool.*, **27**, 1, 28-40.
- STENGER (A. H.) et CHARIPPER (H. A.). — 1946. — A study of adrenal cortical tissue in *Rana pipiens* with special reference to metamorphosis. *J. Morph.*, **78**, 27-38.
- STOLKOWSKI (J.) et REINBERG (A.). — 1956. — Recherches sur le mécanisme de l'action de quelques hormones corticostéroïdes sur le potassium cellulaire. I. Influence du glucose et de l'acide adénosine triphosphorique (ATP) sur les mouvements du K cellulaire. *Ann. Endocr.*, **17**, 137-159.
- STUART (H. A.) et HIGGINS (G. M.). — 1935. — Rhythmic changes in the fetal liver after feeding. *Am. J. Physiol.*, **111**, 590-595.
- TAYLOR (A. C.) et KOLLROS (J. J.). — 1946. — Stages in the normal development of *Rana pipiens* larvæ. *Anat. Rec.*, **94**, 7.
- TIXIER-VIDAL (A.). — 1954. — Étude histophysiologique de l'hypophyse antérieure de l'embryon de Poulet. *Arch. Anat. Micr. Morph. Exp.*, **43**, 163-186. — 1958. — Étude histophysiologique des relations hypophyse-thyroïde chez l'embryon de Poulet. Thèse Paris.
- TOGARI (C.), SUGIYAMA (S.) et SAWASAKI (Y.). — 1952. — On the prenatal histogenesis of the thyroid gland of the rabbit with special emphasis on its histogenesis. *Fol. Anat. Jap.*, **114**, 213-229.
- TOIVONEN (S.) et SAXEN (L.). — 1956. — The development of the oropharyngeal cavity, including thyroid gland, thymus and lungs. In NIEUWKOOP (P. D.) et FABER (J.), 140-149.
- TONEY (M. E.). — 1954. — Histology of the anterior pituitary gland of the frog during normal development. *Growth*, **18**, 215-225.
- TUERKISCHER (E.) et WERTHEIMER (E.). — 1948. — The *in vitro* synthesis of glycogen in the diaphragms of normal and alloxan-diabetic Rats. *Bioch. J.*, **42**, 603-609.
- UHLENUTH (E.). — 1927. — Die Morphologie und Physiologie der Salamander-Schildrüse. I. Histologisch-embryologische Untersuchungen des Sekretionsprozesses in den verschiedenen Lebensperioden der Schildrüse des Marmorsalamanders, *Amblystoma opacum*. *Arch. f. Entw. Mech. Org.*, **109**, 611-749.
- VANNINI (E.). — 1950. — Organogenèse des gonades et déterminisme du sexe chez les Amphibiens et les Amniotes. *Arch. Anat. Micr. Morph. Exp.*, **39**, 295-315. — 1956. — The development of the gonadal system and adrenal glands. In NIEUWKOOP et FABER, 137-139.
- VENZKE (W. G.). — 1949. — Morphogenesis of the thyroid gland of chicken embryos. *Am. J. Vet. Res.*, **10**, 272-281.
- VLADIMIROFF (G. E.) et SCHMIDT (A. A.). — 1926. — Beiträge zur Embryochemie und Embryophysiologie. *Biochem. Zeitschr.*, **177**, 304-308.
- VLADIMIROV (G. E.). — 1931. — The effect of some factors upon the blood sugar of embryo chicks. *J. Physiol.*, **72**, 411-424.
- WALLRAFF (J.). — 1949. — Histochemische Untersuchungen an den Nebennieren des erwachsenen Menschen. *Z. Zellforsch.*, **34**, 362-427.
- WEBER (G.) et CANTERO (A.). — 1955. — Glucose-6-phosphatase activity in regenerating, embryonic and new born rat liver. *Cancer Res.*, **15**, 679-684.
- WELLS (L. J.). — 1948. — Some experimental evidence of production of adrenotrophin by the fetal hypophysis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **68**, 487-488.
- WELLS (L. J.). — 1949. — Microscopical studies of the adrenals of fœtuses deprived of the hypophysis and given adrenocorticotrophin. *Anat. Rec.*, **103**, 563-564. Abstract.
- WESTON (J. C.). — 1956. — The effect of cortisone on some chemical constituents of developing chick liver. *Growth*, **20**, 75-90.
- WILDE (C. E.), Jr. — 1948. — Technical procedures for the study of organogenesis *in vitro* in *Amblystoma*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **69**, 374-376.
- WILLIAMS (R. H.), JANDORF (B. J.) et KAY (G. A.). — 1944. — Methods for the

- determination of thiouracil in tissues and body fluids. *J. Lab. and Chim. Med.*, **29**, 329-336.
- WITSCHI (E.). — 1953 *a.* — The experimental adrenogenital syndrome in the frog. *J. clin. Endocr.*, **13**, 3, 316-329. — 1953 *b.* — Proposals for an international agreement on normal stages in Vertebrate embryology. *XIV^e Intern. Congr. Zool.*, Copenhagen, 260-262. — 1956. — *Development of Vertebrates*. 1 vol. Saunders Cy Philadelphia.
- WLADIMIROW (G. E.). — 1930. — Beiträge zur Embryochemie und Embryophysiologie. V. *Biochem. Zeitschr.*, **224**, 79-82.
- WLADIMIROW (G. E.) et DANILINA (M. J.). — 1930. — Beiträge zur Embryochemie und Embryophysiologie. IV. *Biochem. Zeitschr.*, **224**, 69-78.
- WOITKEWITSCH (A. A.). — 1937. — Besitz die Rinden und Marksicht der Nebenniere von Säugetieren metamorphogene Eigenschaften. *Zool. Jb.*, **58**, 11-22.
- WOLFF (E.) et HAFEN (K.). — 1952 *a.* — Sur une technique permettant la culture *in vitro* des gonades embryonnaires des Oiseaux. *C. R. Ac. Sc.*, **234**, 1396-1398. — 1952 *b.* — Sur une méthode de culture d'organes embryonnaires *in vitro*. *Texas Reports on Biol. and Med.*, **10**, 463-472.
- WOLFF (E.) et STOLL (R.). — 1937. — Le rôle de l'hypophyse dans le développement embryonnaire du Poulet d'après l'étude des cyclocephales expérimentaux. *C. R. Soc. Biol.*, **126**, 1215-1217.
- WOLFF-HEIDEGGER (G.). — 1936. — Experimentelle Studien zur Genese der Langerhansschen Inseln des Pankreas. *Roux Arch.*, **135**, 114-135. — 1937. — Zur Genese der Langerhansschen Inseln des Pankreas (Experimentelle Studien an parabiotischen Amphibienembryonen). *Schweiz. Med. Wschr.*, **1**, 588.
- ZARETZKI. — 1911. — Le glycogène dans le placenta discoïde. *L'obstétrique*, **4**, 378.
- ZORN (C. M.) et DALTON (A. J.). — 1936. — Blood chemistry of the chick embryo during ontogenesis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **35**, 451-453. — 1937. — A chemical study of the blood of the developing chick. *Am. J. Physiol.*, **119**, 627-634.
- ZORZOLI (A.) et CROUSE (J. L.). — 1954. — Liver glycogen content of pre-natal and early post-natal mice. *Anat. Rec.*, **120**, 3, 747 (Abstracts).
- ZWILLING (E.). — 1948 *a.* — Insulin hypoglycemia in chick embryos. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **67**, 192. — 1948 *b.* — Association of hypoglycemia with insulin micromelia in chick embryos. *J. Exp. Zool.*, **109**, 197-214. — 1949. — Reversal of insulin-induced hypoglycemia in chick embryos by nicotinamide and α -ketoglutaric acid. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **71**, 609. — 1951 *a.* — Insulin-induced hypoglycemia and rumplessness in chick embryos. *J. Exp. Zool.*, **117**, 65-73. — 1951 *b.* — Carbohydrate metabolism in insulin treated chick embryos. *Arch. Biochem. et Biophys.*, **33**, 228-242. — 1952. — The effects of some hormones on development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **55**, 196-202.

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Les cultures d'organes
chez les embryons et les larves d'Amphibiens.

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 9 juin 1958.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PÉRÈS.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

JEAN SARRAILH.

PLANCHE XIV

PLANCHE XIV

Fig. 1 à 5. — Échelle théorique et symboles correspondants adoptés pour l'évaluation quantitative du glycogène. A. P. S. sans coloration de fond. $\times 100$.

Fig. 1. — tr. (traces).

Fig. 2. — +.

Fig. 3. — ++.

Fig. 4. — +++.

Fig. 5. — ++++ (surcharge).

Fig. 6 à 9. — Glycogène embryonnaire. A. P. S. sans coloration de fond.

Fig. 6. — *Bufo bufo*. Stade III₉. Muscles somitiques. $\times 50$.

Fig. 7. — *Discoglossus pictus*. Stade 25. Foie. $\times 50$.

Fig. 8. — *Discoglossus pictus*. Stade 30. Intestin. $\times 50$.

Fig. 9. — *Rana temporaria*. Stade 17. Pronéphros. $\times 150$.

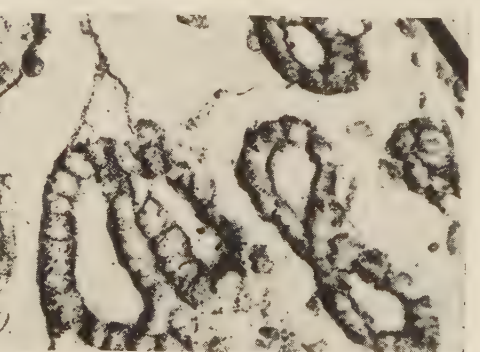
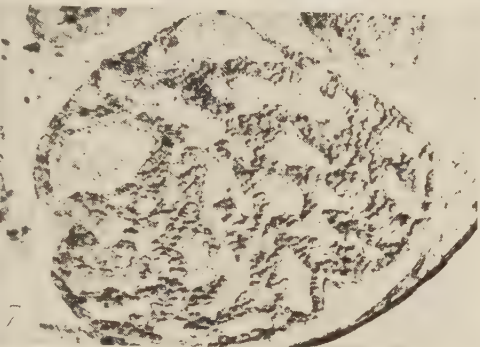
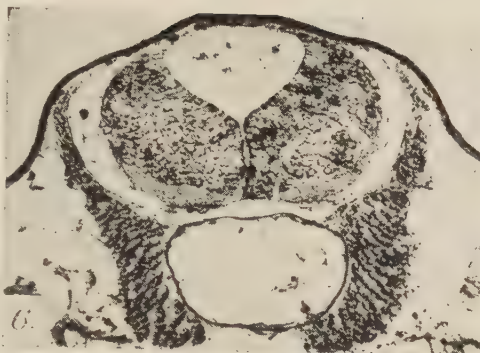
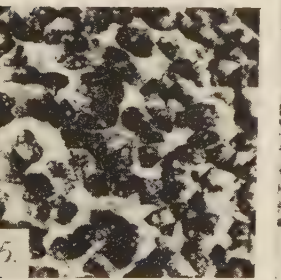
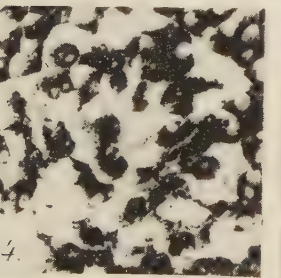
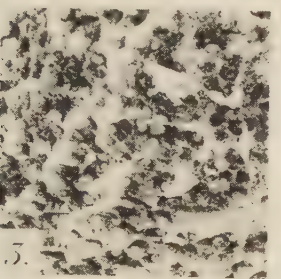
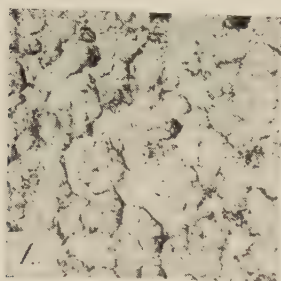
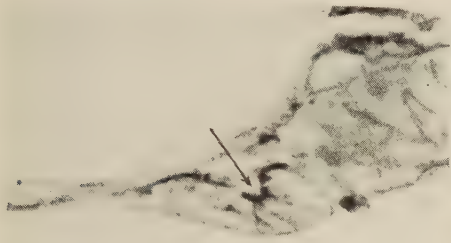


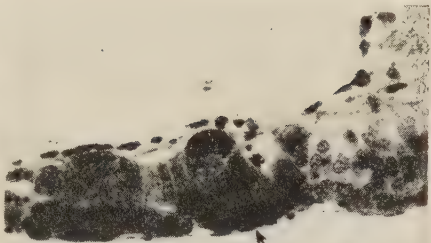
PLANCHE XV

PLANCHE XV

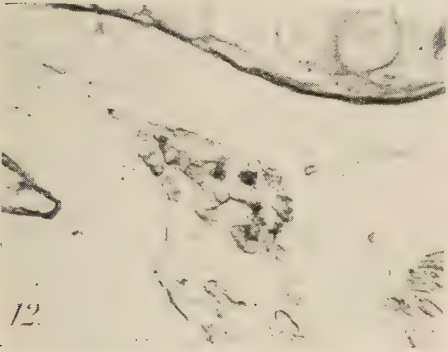
- Fig. 10. — *Alytes obstetricans*. Stade O-I. Adénohypophyse. A. P. S. Premières cellules basophiles. $\times 500$.
- Fig. 11. — *Alytes obstetricans*. Stade III. Adénohypophyse. Azan. Cellules acidophiles fortement azanophiles contre la pars intermedia. $\times 300$.
- Fig. 12. — *Alytes obstetricans*. Éclosion. Thyroïde. A. P. S. Quelques follicules avec colloïde. $\times 300$.
- Fig. 13. — *Alytes obstetricans*. Stade I. Thyroïde. A. P. S. $\times 300$.
- Fig. 14. — *Alytes obstetricans*. Stade II. Thyroïde. Azan. Accroissement du nombre et de la taille des follicules (mitoses), et de la hauteur de l'épithélium. $\times 300$.
- Fig. 15. — *Discoglossus pictus*. Stade 28. A. P. S. Ébauche thyroïdienne impaire pigmentée et A. P. S. positive. $\times 300$.
- Fig. 16. — *Discoglossus pictus*. Stade II. Thyroïde. A. P. S. Premiers follicules avec colloïde. $\times 300$.
- Fig. 17. — *Discoglossus pictus*. Stade IV. Thyroïde. A. P. S. Accroissement de taille des follicules. Pigment encore abondant entre les cellules épithéliales. $\times 300$.
-



10.



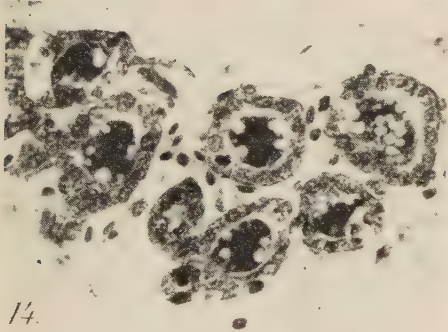
11.



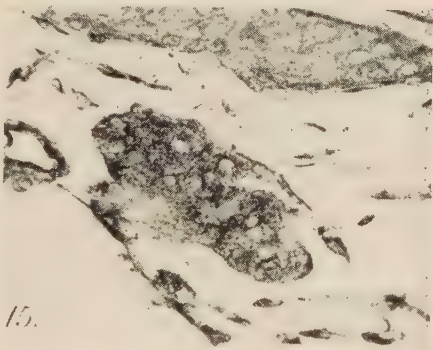
12.



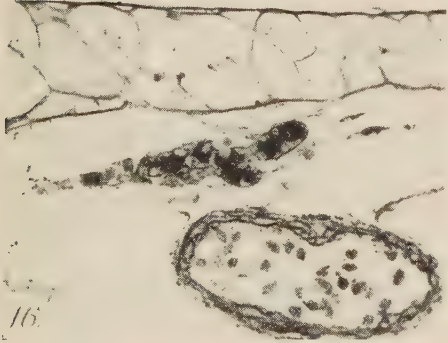
13.



14.



15.



16.

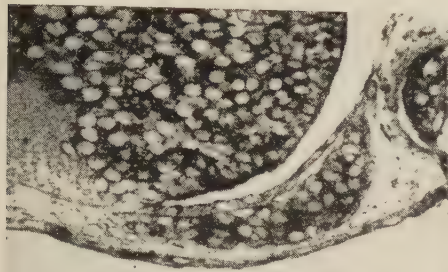


17.

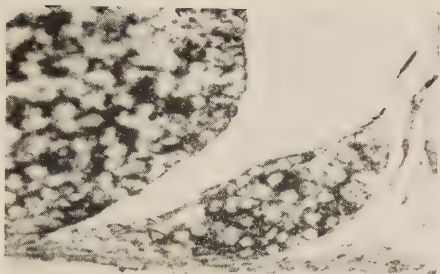
PLANCHE XVI

PLANCHE XVI

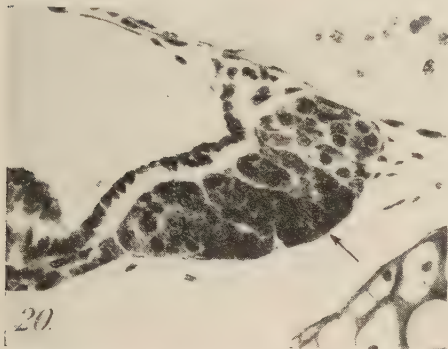
- Fig. 18. — *Rana temporaria*. Stade 15. A. P. S. Adénohypophyse fortement pigmentée et A. P. S. positive. $\times 150$.
- Fig. 19. — *Rana temporaria*. Stade II. A. P. S. Adénohypophyse. La pars intermedia s'individualise en arrière de la pars anterior. $\times 150$.
- Fig. 20. — *Rana temporaria*. Stade IV. Azan. Hypophyse. Pars anterior orangeophile dans sa région moyenne et postérieure. $\times 150$.
- Fig. 21. — *Rana temporaria*. Stade IV. A. P. S. Hypophyse. Premières cellules cyanophiles dans la région moyenne de la pars anterior encore pigmentée. $\times 150$.
- Fig. 22. — *Rana temporaria*. Stade 15. A. P. S. Ébauche thyroïdienne impaire très pigmentée et A. P. S. positive. $\times 150$.
- Fig. 23. — *Rana temporaria*. Stade II. A. P. S. Thyroïde. Premières cavités folliculaires creusées au centre d'anciennes plages pigmentaires. $\times 150$.
- Fig. 24. — *Rana temporaria*. Stade II âgé. A. P. S. Thyroïde. Allongement des deux lobes et multiplication des follicules à cavité très réduite et ceinturée de pigment. $\times 150$.
- Fig. 25. — *Rana temporaria*. Stade IV. A. P. S. Thyroïde. Augmentation de la taille et du nombre des follicules. Réduction du pigment. $\times 150$.
-



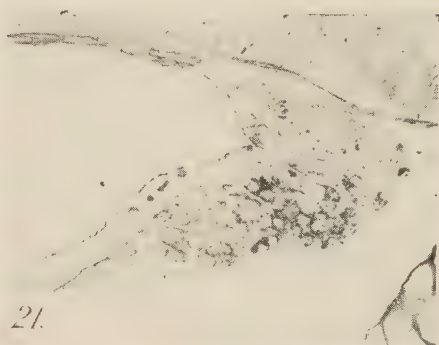
18.



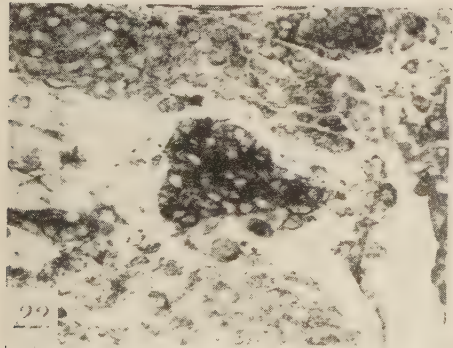
19.



20.



21.



22.



23.



24.

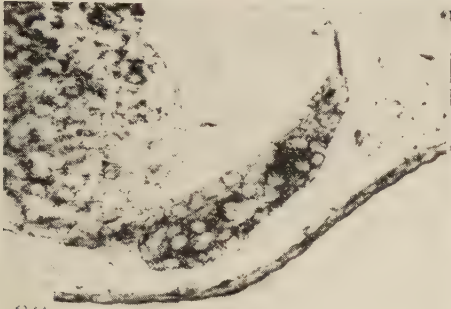


25.

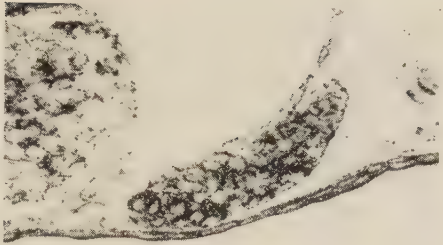
PLANCHE XVII

PLANCHE XVII

- Fig. 26. — *Bufo bufo*. Stade III₈. A. P. S. Adénohypophyse abondamment pigmentée et faiblement A. P. S. positive. × 150.
- Fig. 27. — *Bufo bufo*. Stade III. A. P. S. Adénohypophyse. Début de différenciation de la pars intermedia. × 150.
- Fig. 28. — *Bufo bufo*. Stade IV âgé. Azan. Hypophyse. Premières cellules acidophiles (orangeophiles) dans la région moyenne et postérieure de la pars anterior. × 150.
- Fig. 29. — *Bufo bufo*. Stade V-VI. A. P. S. Hypophyse. Nombreuses cellules basophiles dans la pars anterior encore très pigmentée. × 150.
- Fig. 30. — *Bufo bufo*. Stade III₉. A. P. S. Ébauche thyroïdienne impaire très fortement pigmentée ayant essaimé quelques futurs follicules. × 150.
- Fig. 31. — *Bufo bufo*. Stade III₁₀. A. P. S. Thyroïde. × 150.
- Fig. 32. — *Bufo bufo*. Stade IV jeune. A. P. S. Fort accroissement de taille des follicules. × 150.
- Fig. 33. — *Bufo bufo*. Stade VI. A. P. S. Thyroïde. × 150.
-



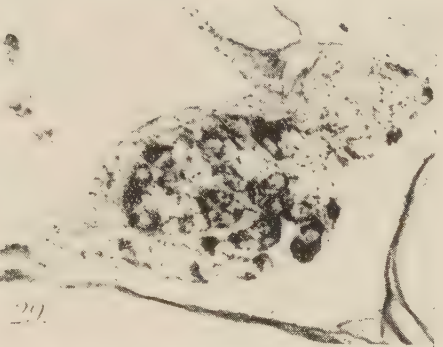
26.



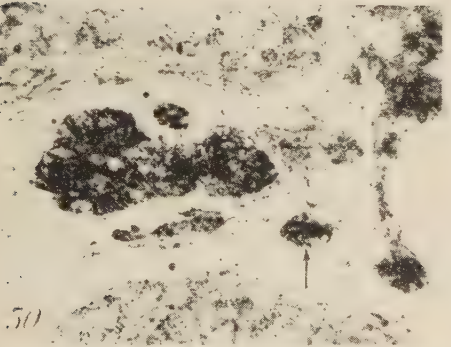
27.



28.



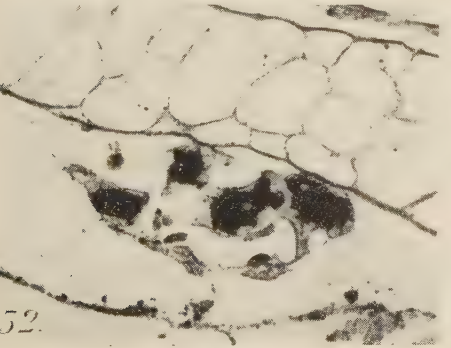
29.



50.



51.



52.



53.

PLANCHE XVIII

PLANCHE XVIII

- Fig. 34. — *Bufo bufo*. Stade III_g. Flemming, triple coloration de Flemming. Blastème rénal faiblement osmiophile. $\times 80$.
- Fig. 35. — *Rana esculenta*. Stade II. Flemming, triple coloration de Flemming. Organe interrénal très nettement osmiophile. $\times 80$.
- Fig. 36. — *Alytes obstetricans*. Stade O-I. Flemming, triple coloration de Flemming. Premières concentrations de cellules interrénales sur les parois latéro-dorsales de la veine cave. $\times 200$.
- Fig. 37. — *Alytes obstetricans*. Stade I. Flemming, safranine, alcool picriqué. Nombreuses gouttelettes osmiophiles dans les tubules des mésonéphrons et l'organe interrénal. $\times 200$.
- Fig. 38. — *Alytes obstetricans*. Stade I. Bouin, hématoxyline chromique-phloxine. Tubules de la glande intrapancréatique. En sombre, la zone acineuse périphérique. $\times 300$.
- Fig. 39. — *Alytes obstetricans*. Stade III. Bouin, azan de Schleicher selon Gabe. Ilot A au contact d'un gros tubule de la glande intrapancréatique. $\times 300$.
- Fig. 40. — *Alytes obstetricans*. Stade I. Bouin, fuchsine paraldéhyde. Ilot B à granulations β périphériques dans un cytoplasme rare, entouré de tubules de la glande intrapancréatique. $\times 300$.
-

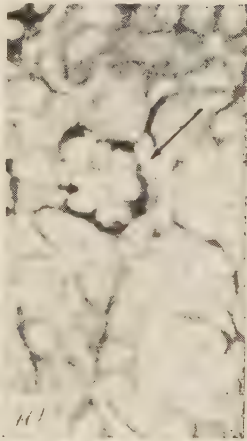
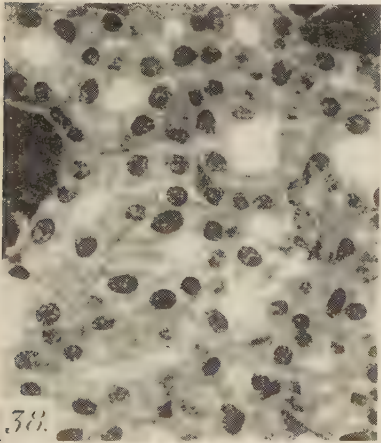
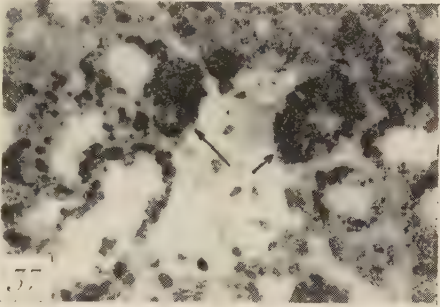
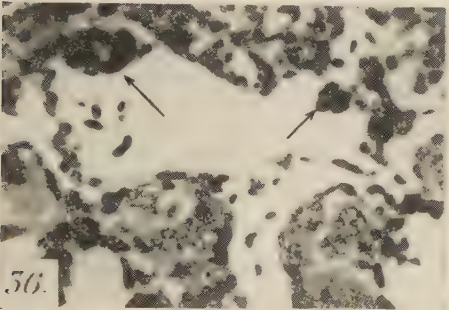
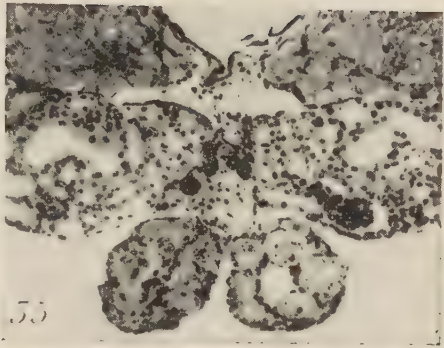
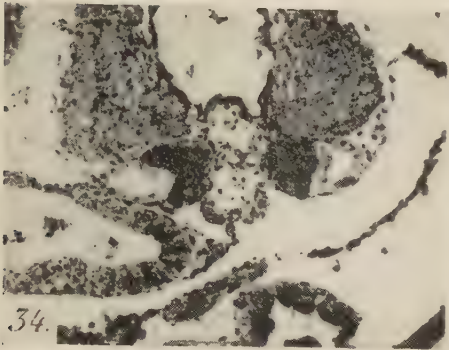


PLANCHE XIX

PLANCHE XIX

- Fig. 41. — *Discoglossus pictus* hypophysectomisé au stade du bourgeon caudal. Stade III, 6 semaines après l'opération et après une semaine d'élevage dans une solution glucosée à 4 0/00. $\times 75$.
- Fig. 42. — Foie du même animal, A. P. S. sans coloration de fond. $\times 75$.
- Fig. 43. — *Discoglossus pictus* pancréatectomisé au stade 24. Stade II, 2 semaines après l'opération. Absence de différenciation de l'intestin, foie très réduit. $\times 25$.
- Fig. 44. — Schéma indiquant la double incision opératoire de pancréatectomie au stade 24. $\times 10$.
- Fig. 45. — Foie du même animal. A. P. S., hématoxyline de Groat. Pigment abondant, glycogène pratiquement absent. $\times 100$.
- Fig. 46. — *Discoglossus pictus* pancréatectomisé au stade 24. Stade II, 2 semaines après l'opération et après 4 jours d'élevage dans une solution glucosée à 4 0/00. Foie très pigmenté mais ayant accumulé du glycogène. A. P. S. $\times 100$.
- Fig. 47. — *Discoglossus pictus* thyroïdectomisé au stade 19. Stade VI, 3 mois après l'opération et après une semaine d'élevage dans une solution glucosée à 5 0/00. A. P. S. $\times 100$.
- Fig. 48. — *Rana temporaria*. Stade XII. Foie surchargé en glycogène après 6 semaines d'élevage dans une solution de thiourée à 0,3 0/00. A. P. S. $\times 100$.

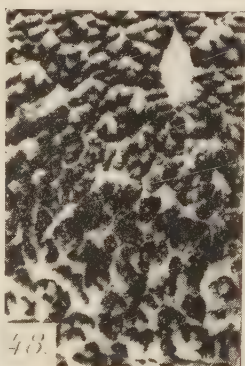
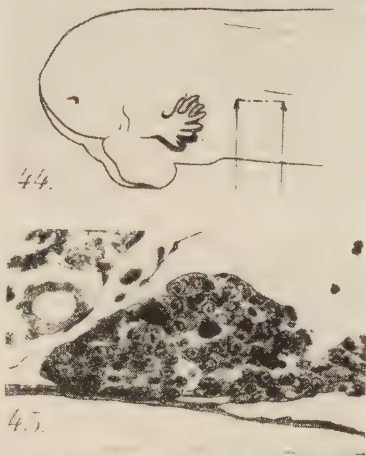
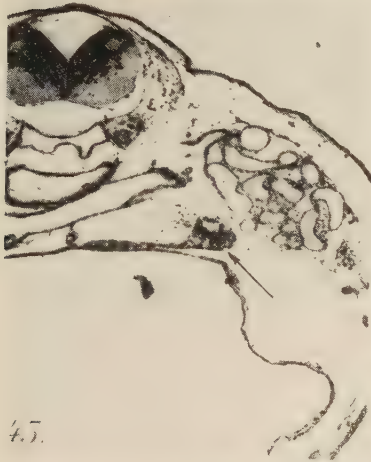
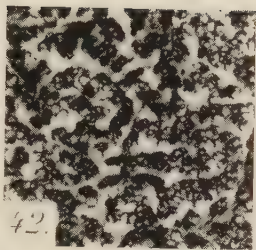
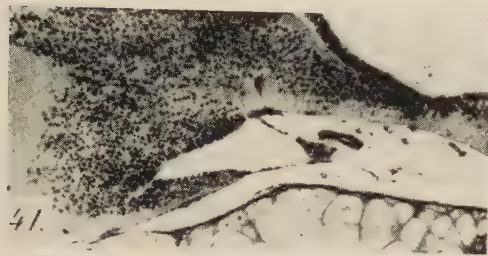


PLANCHE XX

PLANCHE XX

Cultures *in vitro* de foie larvaire sur milieux synthétiques. A. P. S. sans coloration de fond.

Fig. 49. — *Alytes obstetricans*. Éclosion. Ensemble de l'explant après 24 heures de culture sur milieu glucosé à 1 0/00. $\times$ 75.

Fig. 50. — Détail de l'explant. $\times$ 150.

Fig. 51. — *Discoglossus pictus*. Stade 30, après 24 heures de culture sur milieu glucosé à 1 0/00. $\times$ 150.

Fig. 52. — *Discoglossus pictus*. Stade 30-31 après 24 heures de culture sur milieu glucosé à 0,01 0/00. $\times$ 150.

Fig. 53. — *Discoglossus pictus*. Stade 31. Pyruvate à 1 0/00. $\times$ 150.

Fig. 54. — *Bufo bufo*. Stade O-III. Glucose à 1 0/00. $\times$ 150.

Fig. 55. — *Bufo bufo*. Stade O-III. Glucose à 1 0/00 + thyroxine à 10^{-7} . $\times$ 150.

Fig. 56. — *Bufo bufo*. Stade O-III. Glucose à 1 0/00 + cortisone à 10^{-7} . $\times$ 150.

